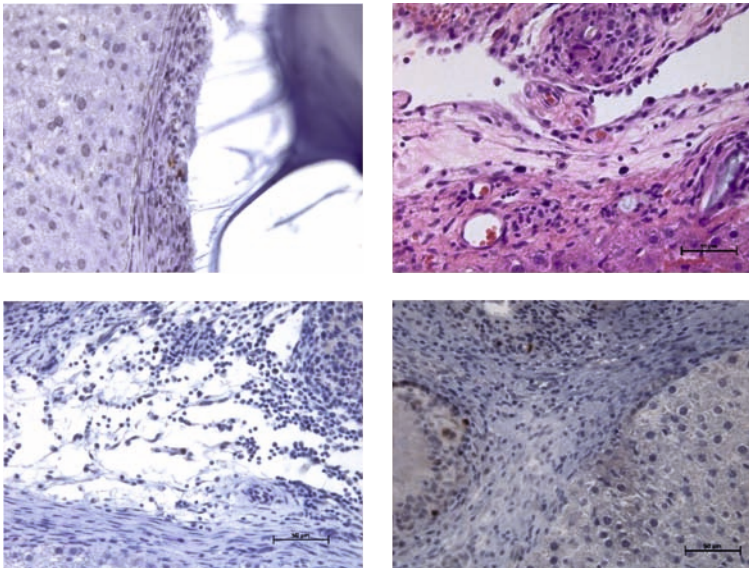


in-vivo-Testung eines neu entwickelten synthetischen Gewebeklebers an einem Leberresektionsmodell an der Ratte

Anna Woitok



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2013

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2013

© 2013 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinärphysiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. med. vet. Gerhard Schultheiß

und

dem Institut für Versuchstierkunde sowie Zentrallaboratorium für Versuchstiere
der Medizinischen Fakultät der RWTH Aachen

Betreuer: Univ.-Prof. Dr. med. René H. Tolba

***in-vivo*-Testung eines neu entwickelten synthetischen
Gewebeklebers
an einem Leberresektionsmodell an der Ratte**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Anna Woitok

Tierärztin aus Aachen

Gießen 2013

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Gerhard Schultheiß

Prof. Dr. René H. Tolba

PD Dr. Martin Gerwing

Tag der Disputation: 15.05.2013

In Andenken an

**meine Oma Irene
und Kyra**

Anfangs wollt ich fast verzagen,
Und ich glaubt, ich trüg es nie;
Und ich hab es doch getragen -
Aber fragt mich nur nicht, wie?

Heinrich Heine

1. Einleitung	1
1.1. Einleitung	1
1.2. Biologische Verträglichkeits- und Sicherheitsprüfung, <i>in-vitro</i> -Toxizitätstestung und non-inferiority Studie	3
1.3. Übersicht über den Mechanismus der Blutstillung und der Blutgerinnung	5
1.4. Gewebekleber	7
1.4.1. Historische Entwicklung der artifiziellen Blutstillung – unter Berücksichtigung der Entwicklung des Gewebeklebers	7
1.4.2. Historische Entwicklung des mechanischen Wundverschlusses – unter Berücksichtigung der Entwicklung des Gewebeklebers	12
1.4.3. Vor- und Nachteile des Gewebeklebers gegenüber dem mechanischer Wundverschluss	15
1.4.4. Zusammenfassende historische Entwicklung des Gewebeklebers	17
1.5. Allgemeines zum neuen Kleber K1	23
1.5.1. Material	23
1.5.2. Vorversuche	24
1.6. Auswahl des Tiermodells	24
1.7. Die Ratte als Versuchstier – kurzer historischer Abriss	25
1.8. Eigene Fragestellung/ Zielsetzung	27
2. Material und Methoden	28
2.1. Versuchstiere	28
2.2. Versuchsplan	28
2.3. Gruppeneinteilung	29
2.4. Versuchsdurchführung	30
2.4.1. Narkose	30
2.4.2. Lagerung, Vorbereitung	31
2.4.3. Operatives Vorgehen	31
2.4.4. Postoperative Nachsorge	35
2.4.5. Versuchsende	35
2.4.6. Messparameter	36
2.4.7. Labordiagnostik	37
2.4.8. Gewebeaufbereitung	37
2.4.9. Histologie	38
2.4.9.1. H.E.-Färbung	38
2.4.9.2. Sirius Red-Färbung	39
2.4.9.3. Immunhistochemie	40
2.5. Auswertung	43
2.5.1. Mikroskopische Untersuchung	43
2.6. Statistische Analyse	47
3. Ergebnisse	49
3.1. Körpergewicht	50
3.2. Blutungszeit	51
3.3. Blutverlust	53
3.4. Reseziertes Leberstück	55
3.5. Laborparameter	56
3.5.1. Erythrozyten	56
3.5.2. Hämoglobin	57
3.5.3. Hämatokrit	58
3.5.4. Leukozyten	59

3.5.5.	Thrombozyten	60
3.5.6.	Aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT)	60
3.5.7.	Aspartat-Aminotransferase (AST)	62
3.5.8.	Alanin-Aminotransferase (ALT)	62
3.5.9.	De-Ritis-Quotient.....	63
3.6.	Intraabdominelle Adhäsion	65
3.7.	Histologie.....	72
3.7.1.	H.E.-Färbung.....	72
3.7.1.1.	Bestimmung der Reaktionszone in μm	72
3.7.1.2.	Bestimmung verschiedener Parameter in der Reaktionszone.....	75
3.7.2.	Sirius Red	90
3.7.2.1.	Bestimmung des Kollagen I/III-Quotienten	90
3.7.3.	Immunhistologie	91
3.7.3.1.	TUNEL-Färbung	91
3.7.3.2.	Ki67 - Färbung.....	95
3.7.3.3.	Cyclooxygenase-2-Färbung (COX-2-Färbung)	98
3.7.3.4.	CD68-Färbung (Makrophagen).....	102
3.7.3.5.	Myeloperoxidase-Färbung (MPO).....	104
4.	Diskussion	106
4.1.	<i>in-vivo</i> – Biologische Sicherheitsprüfung an einem Leberteilresektionsmodell.....	106
4.1.1.	Mögliche Indikationen des neuen Gewebeklebers.....	107
4.1.2.	Auswahl des Tiermodells	108
4.1.3.	Körpergewicht.....	109
4.1.4.	Blutungszeit.....	111
4.1.5.	Blutverlust	112
4.1.6.	Reseziertes Leberstück	114
4.1.7.	Laborparameter.....	114
4.1.8.	Intraabdominelle Adhäsion	117
4.1.9.	Histologie.....	121
4.1.9.1.	H.E.-Färbung	121
4.1.9.2.	Sirius Red (Kollagenfärbung)	127
4.1.9.3.	Immunhistologie	128
4.2.	Schlussbetrachtung.....	135
4.3.	Ausblick.....	137
5.	Zusammenfassung.....	138
6.	Summary.....	140
7.	Literaturverzeichnis.....	142
8.	Danksagung	157
9.	Erklärung	159

1. Einleitung

1.1. Einleitung

Seit tausenden Jahren spielt der Kampf um das Überleben im Tierreich – aber auch in der Menschheit – eine bedeutende Rolle (VON BRUNN, 1935; DRÄGER und GILL, 1990). Wo früher häufig „survival of the fittest“ galt, im Sinne der Darwin'schen Evolutionstheorie, so hat eine stetige Entwicklung und Verbesserung der Medizin dafür gesorgt, dass Tiere und Menschen nun widerstandsfähiger gegenüber Umwelteinflüssen sind. Im Zeitalter der zunehmenden Industrialisierung spielt im Überlebenskampf besonders die Blutstillung eine große Rolle. In den frühen Anfängen der Menschheit wurden die Methoden der Blutstillung vor allem durch instinktives Verhalten, wie Kompression von Wunden, aber auch durch magische und religiöse Einflüsse stark geprägt (DRÄGER und GILL, 1990; CARBON, 2001).

In der heutigen Epoche, in der die Medizin durch intensive Forschung eine enorme Entwicklung durchläuft, stehen verschiedenste Ansätze zur Verfügung, die die Versorgung von blutenden Wunden sicherer und einfacher machen sollen und v. a. die Morbidität und Mortalität bei Traumapatienten, in der Leberchirurgie oder bei verwundeten Soldaten zu senken versucht (BERREVOET und DE HEMPTINNE, 2007; RECINOS et al., 2008; ARNAUD et al., 2007).

Eine wichtige Rolle bei der Blutstillung oder auch bei der Gewebevereinigung spielt die Entwicklung und Verwendung von Gewebeklebern. In der Chirurgie gilt zwar, dass erst eine primäre chirurgische Blutstillung erfolgen muss (URANÜS et al., 1996; CARBON, 2001), aber oft kommen diese Methoden an ihre Grenzen, so dass man durch Gewebekleber die Blutstillung zusätzlich sichern kann oder durch deren Einsatz in der Erstversorgung Leben retten kann.

Bei der Gewebevereinigung wird immer häufiger zum Kleber anstatt zur Nadel und zum Faden gegriffen. Diese Art von Sekundenkleber scheint eine Vielzahl von Vorteilen zu beinhalten: gerade für kleine Patienten, aber auch größere, die Angst vor Spritzen und Nadeln haben, scheint dies ein hervorragende Alternative zu sein, um eine Lokalanästhesie, eine Naht und das lästige Fadenziehen zu umgehen.

Bei den auf dem Markt befindlichen Gewebeklebern, wie zum Beispiel den Fibrinklebern, lassen sich einige Vor- und Nachteile erkennen. So ist der Fibrinkleber sehr teuer und die Produktion sehr aufwendig, da das Risiko einer Übertragung

virusbedingter Infektionen durch die verwendeten Inhaltsstoffe (humanes Fibrinogen) besteht. Bei synthetischen Gewebeklebern kann das Risiko von Infektionen ausgeschlossen werden und die Kosten können gesenkt werden. Es wäre also im Zeitalter eines Gesundheitssystems, dem immer weniger Geld zur Verfügung steht, ein guter Fortschritt, wenn es möglich wäre, einen synthetischen Gewebekleber zu entwickeln, der Kosten spart, aber natürlich auch mindestens so effektiv ist, wie die schon kommerziell erhältlichen Kleber.

Daher soll mit dieser Arbeit ein vollkommen neuer und vollsynthetischer Gewebekleber auf Polyurethanbasis mit Hilfe der biologischen Verträglichkeitsprüfung auf Grundlage der DIN EN ISO 10993 und durch eine biologische Sicherheitsprüfung (nach dem Medizinproduktegesetz) anhand einer tierexperimentellen Studie untersucht werden. Zudem soll die „non-inferiority“ = „Nicht-Unterlegenheit“ des neuen Kleber im Vergleich zu kommerziell erhältlichem Fibrinkleber und Histoacryl gezeigt werden.

1.2. Biologische Verträglichkeits- und Sicherheitsprüfung, *in-vitro*-Toxizitätstestung und non-inferiority Studie

§ 3 des Medizinproduktegesetzes (MPG) regelt den Begriff des Medizinproduktes und definiert diesen als Stoff oder Gegenstand, der zu diagnostischen oder therapeutischen Zwecken bestimmt ist und seine Funktion u.a. in der Behandlung und Linderung von Krankheiten und in der Kompensierung von Verletzungen findet. Das MPG setzt außerdem vor Anwendung eines Medizinproduktes eine biologische Bewertung am lebenden Organismus voraus, um mögliche Risiken ausschließen zu können. Dazu müssen verschiedene *in-vitro* - und *in-vivo* -Tests durchgeführt werden. Die wichtigste Anforderung ist in der DIN EN ISO 10993 zu finden. Teil 1 dieser Norm enthält Anleitungen bezüglich der Grundprinzipien, die für die biologische Beurteilung der Medizinprodukte gelten, außerdem für die Definition der Produkte auf der Basis von Art (mit der Körperoberfläche, von außen mit dem Inneren des Körpers in Kontakt tretend, implantierbare Medizinprodukte usw.) und Dauer des Körperkontaktes (kurzzeitig < 24h, länger > 24h – 30 Tage, dauernd > 30 Tage) und für die Auswahl geeigneter Prüfverfahren. Welche Untersuchungen zur Zulassung des Produktes tatsächlich durchgeführt werden müssen, hängt folglich von dem verwendeten Material und dem Verwendungszweck des Medizinproduktes ab. Bei der Prüfung auf Hämokompatibilität zum Beispiel (Wechselwirkung von Blut mit Fremdoberflächen) wird nach DIN EN ISO 10993-4 gearbeitet und ein Differentialblutbild, die Thrombozytenzahl, die partielle Thromboplastinzeit oder die Komplementaktivierung bewertet. Eine mögliche Zytotoxizität wird nach DIN EN ISO 10993-5 („Prüfungen auf *in-vitro*-Zytotoxizität“) überprüft und ist als Grundlage für alle Medizinprodukte anerkannt und notwendig. Im Falle einer Nicht-Verträglichkeit können *in-vivo* –Versuche entfallen und unnötige Tierversuche vermieden werden. Montanaro et al. (2001) haben zum Beispiel zwei verschiedene Cyanoacrylate gemäß DIN EN ISO 10993 und EN 90993 untersucht und herausgefunden, dass die verwendeten Klebstoffe unverdünnt zu einer schweren Zytotoxizität führten. Nachdem die Substanzen jedoch in einem bestimmten Verhältnis verdünnt wurden, war die Toxizität in einem akzeptablen Bereich.

§ 1 der Medizinprodukteverordnung (MPV) definiert entsprechend § 7 des MPG's die grundlegenden Anforderungen, die zur Bewertung von Medizinprodukten

herangezogen werden müssen. So ist nach § 2 der MPV nur dann eine biologische Sicherheitsprüfung eines Produktes anhand von Tierversuchen durchzuführen, wenn sie zum einen nach dem Stand der Wissenschaft nötig ist, und wenn durch die *in-vitro*- Tests nach dem MPG eine erste biologische Unbedenklichkeit bewiesen wurde.

Eine biologische Beurteilung eines neuen Endproduktes soll also bestimmen, ob von dem Produkt selber eine potenzielle Gefahr (z.B. eine toxische Substanz) ausgeht, oder ob sonst irgendeine mutagene-, sensibilisierende-, hämoinkompatible- oder unerwünschte Wirkung durch die Verwendung entsteht. So ist diese Beurteilung immer dann durchzuführen, wenn das Medizinprodukt jegliche Art von Kontakt zum Patienten haben soll.

Mit der vorliegenden Arbeit soll zusätzlich zur biologischen Verträglichkeitsprüfung (DIN EN ISO 10993) und zur biologischen Sicherheitsprüfung (nach dem MPG) auch die „non-inferiority“ des neuen Medizinproduktes gezeigt werden. Das bedeutet, der vollsynthetische Kleber wird in der *in-vivo* Studie im Vergleich zu zwei kommerziell erhältlichen Gewebeklebern (Fibrinkleber und Histoacryl) getestet, um nachzuweisen, dass der neue Kleber mindestens genauso gut wie die klinisch anerkannte Standardtherapie ist. Eine non-inferiority Studie hat nicht das Ziel, die Überlegenheit eines neuen Produktes zu belegen, sondern vielmehr die „Nicht-Überlegenheit“ = Gleichwertigkeit zu beweisen (LANGE et al., 2007).

Erst nach erfolgter Biokompatibilitätsprüfung und biologischer Sicherheitsprüfung im Tiermodell darf letztendlich eine klinische Prüfung eines neuen Medizinproduktes beim Menschen durchgeführt werden.

1.3. Übersicht über den Mechanismus der Blutstillung und der Blutgerinnung

Unter dem Begriff Blutstillung versteht man jegliche Maßnahmen, die eine Blutung stoppen. Dies bedeutet, es stehen dem Organismus verschiedene körpereigene Mechanismen zur Verfügung, und der Medizin unterschiedliche Medikamente und Utensilien, die als Hämostatika oder Hämostyptika bezeichnet werden und die körpereigene Mechanismen unterstützen können.

Egal, welcher blutungsstillende Schritt eingeleitet wird, es ist immer wichtig, dass dieser möglichst schnell durchgeführt wird, damit der Organismus nicht übermäßig Blut verliert.

Das Hämostasesystem eines Lebewesens ist ein kompliziertes und komplexes Geschehen, das verschiedene Stufen der Blutstillung und Blutgerinnung umfasst.

Bei der Verletzung eines Blutgefäßes ist das wichtigste Ziel die Abdichtung durch einen Fibrin-Thrombus (HUPPELSBERG und WALTER, 2009). Zunächst findet eine schnelle Blutstillung statt (innerhalb von Sekunden bis Minuten), die primäre Hämostase genannt wird. Die zweite Phase (sekundäre Hämostase) schließt sich an und ersetzt den provisorischen Verschluss durch ein stabiles Fibringerüst. Durch ein komplexes Zusammenspiel von verschiedenen Gerinnungsfaktoren wird das freie Fibrinogen in Fibrin umgewandelt, dass ein Fibrinnetz ausbildet und somit die Blutungsquelle vollständig abdichten kann (JELKMANN, 2005).

Die Thrombozyten spielen bei der Blutgerinnung eine wichtige Rolle, da sie bei ihrer Aktivierung Granula freisetzen, die wiederum verschiedene Substanzen für die Blutgerinnung beinhaltet.

Bei der primären Hämostase kommt es nach Verletzung der Gefäßendothelschicht zur Vasokonstriktion, zur Strömungsverlangsamung und Bildung eines Thrombozytenpfropfes. Die Thrombozyten liegen normalerweise frei im Blut vor, nur bei einer Zusammenhangstrennung von Endothelzellen können sie an den freigewordenen subepithelialen Kollagenfasern haften und werden so aktiviert (HUPPELSBERG und WALTER, 2009). Der von-Willebrand-Faktor (vWF) spielt eine wichtige Rolle bei der primären Hämostase. Er wird von den Endothelzellen produziert und kommt zum Teil gebunden an den Faktor VIII im Plasma und zum Teil

subendothelial vor. Bei der Verletzung eines Gefäßes bindet sich vWF an das Kollagen, das dann wiederum von den Thrombozyten gebunden wird. Die Leukozyten sind ebenfalls in das ganze Geschehen involviert, da sie den sogenannten Plättchen-aktivierenden Faktor sezernieren, der die Aggregation der Thrombozyten unterstützt (JELKMANN, 2005). Die Thrombozytengranula fördert u.a. die Vasokonstriktion, die plasmatische Gerinnung und fördert zudem die Wundheilung durch verschiedene Wachstumsfaktoren.

Am Ende der primären Hämostase steht der Thrombozyten-Pfropf (weißer Thrombus).

Die sekundäre Hämostase verschließt die Gefäßverletzung durch ein dichtes Fibrinnetz, das im Rahmen der Wundheilung durch neues Gewebe und Endothel ersetzt wird (HUPPELSBERG und WALTER, 2009). Die Bildung von Fibrin entsteht durch zwei verschiedene Aktivierungswege, die eine gemeinsame Endstrecke haben. Man spricht von der exogenen (extrinsische System) und der endogenen (intrinsische System) Aktivierung. Der extrinsische Weg läuft sehr schnell ab und kommt v.a. bei Verletzungen mit Zellzerstörung vor (SCHMIDT, 2001). Das intrinsische System kommt meistens bei Endotheldefekten vor und läuft langsamer ab.

Die exogene Aktivierung findet durch die Freisetzung von Membranphospholipiden statt. Ca^{2+} -Ionen aktivieren zusammen mit den Phospholipiden den Gerinnungsfaktor VII, der dann anschließend mit dem Plättchenfaktor 3 und Ca^{2+} einen Komplex bildet. Das intrinsische System wird durch die Aktivierung des Faktors XII mit den freigelegten Kollagenfasern gestartet. Anschließend folgt eine komplexe Gerinnungskaskade mit unterschiedlichen proteolytischen Enzymen, die als inaktive Form vorliegen und durch den Ablauf des Systems nacheinander aktiviert werden (JELKMANN, 2005).

Beide Gerinnungssysteme enden mit einer gemeinsamen Endstrecke und dem entstehenden Fibrinnetz. Bei dem letzten Schritt spielen die Faktoren V und X eine große Rolle. Sie bilden zusammen mit Ca^{2+} und Phospholipiden den Prothrombin-Aktivator-Komplex. Dieser Komplex ist in der Lage die Umwandlung von Prothrombin II zu Thrombin IIa zuzulassen. Das Thrombin wiederum wandelt das Fibrinogen in Fibrin um. Außerdem aktiviert es erneut den Faktor V, VII, XI und XII.

Das zunächst lockere Fibrinnetz wird anschließend durch den aktivierten Faktor XIIIa kovalent verbunden.

1.4. Gewebekleber

1.4.1. Historische Entwicklung der artifiziellen Blutstillung – unter Berücksichtigung der Entwicklung des Gewebeklebers

Die Hämostase stellt ein wichtiges Fundament der Chirurgie dar (CARBON, 2001) und gehört zur ältesten Aufgabe der Chirurgie (SACHS, 2000), da ohne Kontrolle von Blutungen keine medizinischen Eingriffe oder Behandlungen möglich wären.

Für Menschen erscheint seit tausenden von Jahren eine Blutung als Albtraum und Laien neigen schnell zur Übertreibung, wohl auch wegen der roten Färbekraft des Blutes, die dem ganzen einen besonderen Ausdruck verleiht (VON BRUNN, 1935).

Es wird vermutet, dass die Menschen schon zu Urzeiten die digitale Kompression und den Kompressionsverband kannten (DRÄGER und GILL, 1990). So werden diese Maßnahmen als älteste Methoden zur Blutstillung angesehen (SACHS, 2000). Ebenso alt wie die Kompression ist die Wahl der Beschwörung, der Besprechung oder verschiedener Zaubermittel (VON BRUNN, 1935; CARBON, 2001), die die Heilkunst und deren Entwicklung stark geprägt haben (SACHS, 2000). Schon damals wurde diese Vorgehensweise häufig abgelehnt oder mit Schmunzeln betrachtet, dennoch auch von Gebildeten angewendet (VON BRUNN, 1935).

Man möchte meinen, dass diese Handlungen nur in eine Zeit gehörten, in der man an Geister und Dämonen glaubte, doch noch heute gibt es zum Beispiel Völker in Indonesien, die magische Handlungen praktizieren, um blutende Wunden zu stillen (SACHS, 2000). Nach Ansicht dieser Kultur hat nur ein bestimmtes Holz, aus dem eine Figur geschnitzt wird, eine blutstillende Wirkung. Die Figur wird an einem rauen Stein gerieben, der Staub anschließend mit Wasser zu einer Paste vermengt und auf die Wunde aufgetragen.

Von der Antike bis in das 19. Jahrhundert, im Zeitalter der Humoralpathologie, wurde die lokale oder orale Anwendung von pflanzlichen bzw. tierischen Haematostyptica befürwortet. Erkrankungen wurden auf ein Ungleichgewicht der vier Körpersäfte (Blut, Schleim, gelbe und schwarze Galle) zurückgeführt und den verschiedenen Säften wurden unterschiedliche Grundqualitäten gegenübergestellt (warm, kalt, feucht, trocken). Zur Heilung musste eine entgegengesetzte Qualität angewendet werden. Bei einer Blutung, die entsprechend dieser Regel als warm und feucht klassifiziert wurde, wurden alte und trockene Haematostyptica, wie

Heidelberre, Blütenblätter des Granatapfelsbaumes und der Granatapfelschalen, Vogelbeeren, Eichengallen, Bolus armenicus, Rosenblütenblätter, Weihrauch angewendet.

Im Altertum, zur Zeit der Belagerung von Troja (12.-13. Jahrhundert v. Chr.), waren Ärzte und Götter als Operateure aktiv und für die Blutstillung zuständig. An ihren Handlungen lässt sich erkennen, dass sie schon zu ihrer Zeit blutstillende Methoden kannten, die zum Einen verklebend waren, zum Anderen zusammenziehend wirkten und zudem auf der anderen Seite den Schmerz linderten (HEEGER, 1910).

Nach dem Trojanischen Krieg wurden zwei Mittel sehr bekannt: die achilleische Lanze und der Knoten des Herkules, über den allerdings bis heute nicht viel zu erfahren ist. Die Lanzespitze bestand aus Eisen und der Eisenrost fungierte als Styptikum (HEEGER, 1910).

Die klassische Chirurgie begann mit Hippokrates (460-377 v. Chr.), dem Vater aller Ärzte (DRÄGER und GILL, 1990). Er kannte weder den Unterschied der Gefäße noch den Puls (HEEGER, 1910), aber er kannte und verwendete damals schon die Kälte, die Kompression durch feste Verbände und verschiedene Styptika zur Blutstillung (CARBON, 2001).

Celsus (rund 300 Jahre später) hat einen weiteren wichtigen Weg vorbereitet. Er schrieb eine 8-bändige Enzyklopädie, die den hohen Wissensstand der Ärzte zu jener Zeit erkennen lässt (DRÄGER und GILL, 1990; SACHS, 2000). Er kannte schon damals die thermische Blutstillung mit Hilfe des Glüheisens und die Ligatur (CARBON, 2001) und die bis heute noch üblichen Styptika (HEEGER, 1910). In seiner Enzyklopädie beschrieb er, dass man eine Wunde mit Verbandstoff ausfüllen und Druck per Hand ausüben sollte (VON BRUNN, 1935; SACHS, 2000), außerdem empfahl er Verbandstoffe, die mit Essig getränkt wurden und das Auflegen von blutstillenden Substanzen (Akaziensaft, Aloe, Gummi oder Töpfererde). Celsus pries zudem das Auftragen von Schwämmen an, ebenso das Auflegen von Spinnweben bei kleineren Wunden, bei größeren Wunden sollte geschorene Wolle verwendet werden (HEEGER, 1910).

Die beste Beschreibung eines Operationsverfahrens in der Antike stammt von Antyllos im 3.- 4. Jahrhundert n. Chr. (SACHS, 2000). Er beschrieb ausführlich die Methode der Arterienumstechung eines Extremitätenaneurysmas zur Verhinderung einer arteriellen Blutung.

In den nächsten 1200-1500 Jahren lassen sich in der Historie der Blutstillung keine weiteren erheblichen Entwicklungen nachweisen (SACHS, 2000).

In Deutschland wurde im Mittelalter die Chirurgie von Badern, Barbieren und Feldscheren betrieben, so dass Kaiser Friedrich II. (1220-1250) Medizingesetze erschaffte (DRÄGER und GILL, 1990).

Bedingt durch Kriege wurden Militärärzte zu den besten Chirurgen ausgebildet (DRÄGER und GILL, 1990). Während der großen Kämpfe in Preußen konnte Heinrich von Pfolsprundt 1460 3000-4000 Menschen heilen, indem er Baumwolle fest auf die Wunden legte und festband und das Ganze mit einem Eiweiß- oder Flachspflaster abdeckte.

Hieronymus Braunschweig formuliert Ende des 15. Jahrhundert in einem Lehrbuch die gleichen Blutstillungsmethoden wie Celsus (SACHS, 2000). Er teilt diese in örtliche und allgemeine Prozeduren ein. So galten als allgemeine Maßnahmen das Reiben und Binden der Glieder und der Verschluss der Augen. Zu den lokalen Maßnahmen zählen der Fingerdruck, Styptika (Eierklar, zerschnittenes Hasenhaar, Aloe), das Brennen (Kalken, Arsenik, Glüheisen) und die Gefäßunterbindung (HEEGER, 1910; SACHS, 2000).

Der größte Chirurg im 16. Jahrhundert war Ambroise Paré (1517-1590) (VON BRUNN, 1935). Während einer Schlacht in Turin (1537) versorgte Paré Verwundete mittels kochenden Öls. Da das Öl schnell verbraucht war, entwickelte der Chirurg einen Ersatz; er mischte Eigelb, Rosenöl und Terpentin zusammen und schmierte das Gemisch auf die Wunden. Überraschend für ihn: die Wunden sahen in den darauf folgenden Tagen besser aus, als die mit heißem Öl behandelten. So erkannte er als erster seiner Zeit, wie gefährlich es ist, die Heilungsvorgänge des Körpers zu stören. Paré entwickelte eine spezielle Gefäßfasszange (VON BRUNN, 1935; SACHS, 2000), die es ermöglichte Gefäße während der Amputation zu packen und zu unterbinden, und nicht zu kauterisieren. So wurden die Ligaturen nach langer Wartezeit wieder in die Chirurgie eingeführt (VON BRUNN, 1935) und zusammen mit der Fasszange wurde dies die Standardmethode der Gliedmaßenamputation (SACHS, 2000).

Die Medizin und die Geschichte der Blutstillung machten im 17. Jahrhundert weitere Fortschritte. Unter anderem entdeckte William Harvey 1628 den großen Blutkreislauf (DRÄGER und GILL, 1990).

Moser benutzte 1631 eine Schraube zur Gefäßkompression (VON BRUNN, 1935). Morel modifizierte den Knebel und erschuf 1674 das Tourniquet (SACHS, 2000; RINGE, 2001). Der Franzose Jean Louis Petit veröffentlichte 1718 ein Schraubentourniquet, das sehr lange bei Amputationen gebräuchlich war (VON BRUNN, 1935; SACHS, 2000). Petit erkannte 1710, dass die Blutstillung mit der Bildung von Gerinnseln einhergeht, die wie ein Deckel auf dem Defekt wirken (CARBON, 2001).

Man findet Angaben in der Literatur, dass 1787 sogar Tischlerleim zur Blutstillung verwendet wurde (CARBON, 2001).

Die Einführung der Narkose im Jahre 1849 führte zur erheblichen Verbesserung und einer nachhaltigen Entwicklung in der Geschichte der Medizin (CARBON, 2001).

1854 wurde durch den Chirurgen Middeldorpf die Kauterisierung eingeführt. Die heute benutzte Koagulation ist ähnlich der Methode von 1854.

Heute werden gezielt lokal Hämostatika angewendet (z.B. Gaze aus oxidierte Cellulose), die stark an eine Empfehlung der Fürstin Eleonora Rosalia erinnern: „schneid ein Fleck auß ein Filzhut/ und lege ihn auff das Blut“ (SACHS, 2000). Auch wenn heute immer noch Methoden benutzt werden, die hunderte von Jahren alt sind, so schreitet die Entwicklung im 21. Jahrhundert in großen Schritten voran, immer auf der Suche nach der optimalen Lösung.

Bis zur heutigen Zeit sind einige Hämostatika im Einsatz, die die traditionellen Blutstillungsmethoden unterstützen (RECINOS et al., 2008), und die man in lokale und systemische Substanzen einteilt. Die oxidierte Zellulose, Fibrinkleber (Beriplast®, Floseal® etc.), synthetische Kleber (Coseal®, BioGlue®, Crosseal® etc.) und neue Materialien wie Zeolite (QuickClot®) (WRIGHT FL et al., 2004; Wright JK et al., 2004; PUTSATERI et al., 2004; MAHAJNA et al., 2007; ARNAUD et al., 2007; PLURAD et al., 2009) oder Chitosan (CELOX®) (beide sind nur zur äußeren Anwendung zugelassen) gehören zu den lokalen Methoden. Der rekombinante Faktor VIIa wird seit einiger Zeit systemisch eingesetzt um die Hämostase bei hartnäckigen Blutungen zu unterstützen.

Bedeutend bei der großen Palette an verschiedenen erhältlichen Produkten ist, dass der Chirurg, der sich für eine Methode entscheiden muss, mit dieser vertraut ist und die Vor- und Nachteile der Produkte kennt (RECINOS et al., 2008).

Es werden in den letzten Jahren fortwährend neue Produkte getestet (TURNER et al., 2002; CHAPMAN et al., 2000) und auf den Markt gebracht, immer mit dem Ziel die Blutstillung sowohl einfacher, als auch sicherer zu gestalten und die Morbidiäts- und Mortalitätsraten zu senken (BERREVOET und DE HEMPTINNE, 2007; RECINOS et al., 2008). So testete Prior et al. 2000 ein neues spraybares Hämostatikum im Vergleich zu anderen kommerziell erhältlichen Produkten in einem in vivo Kaninchenmodell. Einige neue Fibrinkleber wurden ebenfalls im Tiermodell ausgetestet und auf ihre Wirksamkeit überprüft (DAVIDSON et al., 2000; SCHWARTZ et al., 2004). Das US Militär forscht ebenfalls immer noch beständig an neuen Hämostatika (ALAM et al., 2003; ALAM et al., 2004; PUTSATERI et al., 2004; WRIGHT et al., 2004; MAHAJNA et al., 2007; ARNAUD et al., 2007; PLURAD et al., 2009).

Besonders wichtig ist die Entwicklung neuer Blutstillungsmethoden in der Leberchirurgie. Die chirurgischen Techniken haben sich in den letzten Jahrzehnten immer weiter entwickelt. Doch trotz des Einsatzes dieser neuen und nun herkömmlichen Methoden wie Argonbeamer, Koagulieren, Ultracision, Nähen, Clips, Ligieren einzelner Gefäße, Ligieren des Parenchyms, Pringle Manöver etc. (TachoSil, Wissenschaftlicher Bericht, 2005; NUR et al., 2005; BERREVOET und DE HEMPTINNE, 2007) reichen diese Anwendungen häufig nicht aus, so dass man versucht mit anderen Mitteln, wie Fibrinkleber, Vliesen, Schwämmen, synthetischen Klebern die Hämostase zusätzlich zu sichern. In der Leberdiagnostik spielt die Leberbiopsie eine entscheidende Rolle, bei der es in 0,06-1,7 % der Fälle zu Blutungskomplikationen kommen kann. Auch dies ist ein Einsatzgebiet für den Gewebekleber (PAULSON et al., 2000; TERJUNG et al., 2003; VAN DER POORTEN, 2006).

Es ist allerdings ausdrücklich darauf hinzuweisen, dass bei der chirurgischen Blutstillung und bei der Gewebeklebung, insbesondere in der hepatobiliären Chirurgie erst eine primäre chirurgische Blutstillung erfolgen muss (URANÜS, et al., 1996; CARBON, 2001) und somit nicht vollständig durch Gewebekleber zu ersetzen ist (TachoSil, Wissenschaftlicher Bericht, 2005). Erst bei anhaltenden, hartnäckigeren Blutungen können Kleber, Vliese oder Tamponade eingesetzt werden (CARBON, 2001). So konnten durch die Entwicklung von neuen Klebern die Eingriffe in der Leberchirurgie sicherer gemacht werden.

1.4.2. Historische Entwicklung des mechanischen Wundverschlusses – unter Berücksichtigung der Entwicklung des Gewebeklebers

Die Geschichte der Naht, des Wundverschlusses und der Wundversorgung ist mindestens so alt wie die Menschheit selber (SCHUMPELICK, 2008). So wurden klebrige Stoffe, wie Honig oder Gerstenschleim benutzt, um Leinenstreifen zu bestreichen und um damit Wunden zusammenzuhalten oder auch als einfache Verbände zu gebrauchen (ASMUSSEN und SÖLLNER, 2000). Die Leinenstreifen gelten als Vorläufer der heutigen erhältlichen Wundstreifen (z.B. Sterigrab®, Trusetal Verbandstoffwerk, GmbH).

Im alten Ägypten wussten die Menschen längst, dass Wunden besser heilen, wenn die Wundränder zuvor adaptiert wurden (ASMUSSEN und SÖLLNER, 2000). Besonders beliebt war die Ameisennaht in der Antike als Vorreiter der heutigen Klammernahttechnik. Man ließ große Ameisen in einen zusammengepressten Wundrand beißen, trennte den Tieren anschließend blitzschnell den Rumpf vom Kopf ab, so dass die festgebissenen Kiefer der Ameisen die Wundränder fest zusammenhielten (SCHUMPELICK, 2008). Diese Methode wird heute noch von einigen Naturvölkern in Afrika und Südamerika praktiziert (ASMUSSEN und SÖLLNER, 2000).

Durch überlieferte Schriften lässt sich belegen, dass die Ägypter bereits 3000 v. Chr. eine Öhrnadel als Instrument benutzten und diese heute als ältestes Instrument der Chirurgie gilt. Die älteste gefundene Naht stammt aus dem Jahre 1100 v. Chr. und wurde an einer Mumie identifiziert (RODEGRA, 1982; SCHUMPELICK, 2008). Obwohl man die älteste Naht nur bis in das Jahr 1100 v. Chr. zurückverfolgen kann, lässt sich anhand von beschriebenen Hinweisen vermuten, dass auch schon 2500 v. Chr. ein Wundverschluss mittels Leinenfäden, Sehnen, Haaren oder Pflanzenfasern praktiziert wurde (SMITH, 1973; DRÄGER und GILL, 1990).

Hippokrates kannte 400 v. Chr. verschiedene Nahtmaterialien und verwendete diese um Gefäße abzubinden oder Gewebedefekte zu verschließen. Celsus (25-50 n. Chr.) und Galen (129-199 n. Chr.) haben ebenfalls einzelne Nahttechniken in ihren Büchern dargelegt.

Die Chirurgen im 12.-13. Jahrhundert waren sich uneinig, ob es besser ist, die Wundränder direkt zu verschließen oder ob eine Heilung der Wunden durch Eiterung zu einem besseren und schnelleren Erfolg führen könnte. So tamponierten einige

Operateure Wunden, um eine Eiterung hervorzurufen, wohingegen die Franzosen eine ordentliche Wundversorgung und Reinigung mit anschließender Wundvereinigung für nötig hielten, so wie es Hippokrates gelehrt hatte (ABEL, 1996). Erst im Mittelalter finden sich ausführliche Beschreibungen zu Nahttechniken. Bedingt durch schwere Verwundungen in Schlachten entwickelte sich die Naht weiter und im „Feldbuch der Wundartzney“ (1517) hinterlegte der Feldarzt Hans von Gersdorf seine Erkenntnisse zur Gewebevereinigung (ASMUSSEN und SÖLLNER, 2000).

Ligaturen und Nähte tierischer Herkunft wurden bis ins 17. Jahrhundert verwendet, allerdings entstanden bei der Wundheilung immer (unerwünschte) Infektionen. Daher war man zu dieser Zeit der Naht sehr skeptisch gegenüber eingestellt (NOCKEMANN, 1992).

Im 16. Jahrhundert tauchte erstmalig der Name Katgut (aus Schafdärmen hergestelltes Nahtmaterial) im Lexikon auf (SCHUMPELICK, 2008). Im 19. Jahrhundert wurde außer Katgut auch Gold, Silber, Seide, Leinenzwirn, Baumwolle etc. behandelt, damit es antiseptisch zum Einsatz kommen konnte (NOCKEMANN, 1992).

1909 beschrieb Bergel als erster die Fähigkeit von Fibrin als Blutgerinnungsprotein und erkannte richtig, dass Fibrin eine hämostatische und wundheilungsfördernde Komponente enthält (BERGEL, 1909; LERNER und BINUR, 1990). Der Fibrinkleber ist deshalb so gut einsetzbar, weil er auf physiologischem Wege die letzte Stufe der Blutgerinnung nachahmt (LERNER und BINUR, 1990). Bedingt durch diese Fähigkeit kann der Kleber als Hämostatikum zum Verschluss von Wunden und zur Unterstützung der Wundheilung eingesetzt werden (SPOTNITZ et al., 1997).

1935 wurde das erste synthetische Nahtmaterial auf Polyvinylbasis hergestellt. 1939 konnten ummantelte Polyamidfäden (Perlon, Nylon) fabriziert werden (SCHUMPELICK, 2008). Die erste resorbierbare Naht wurde 1970 produziert, so dass die sonst übliche Gewebereaktion dadurch reduziert wurde und eine signifikant höhere Reißfestigkeit belegt werden konnte.

In den Jahren zwischen der Entdeckung von Bergel (1909) und der klinischen Anwendung des Fibrinklebers, lagen alle Hoffnungen bei der Entwicklung und Wirkung der Cyanoacrylate, die in den 50er Jahre zufällig von Coover et al. entdeckt wurden (MATSUMOTO et al., 1967). Unter Cyanoacrylaten versteht man flüssige,

monomere Verbindungen, die bei Raumtemperatur (COOVER et al., 1959), in kürzester Zeit bei Kontakt mit Wassermolekülen (HARRIS und TEBBY, 1986) unter einer exothermen Reaktion polymerisieren (ASMUSSEN und SÖLLNER, 2000), wenn sie dünn auf einer Klebefläche verteilt werden (SMITH, 1973). Durch die Polymerisation entsteht eine Verbindung, die eine hohe Klebekraft und Haftfestigkeit aufweist (GIEBEL et al., 1981) und aufgrund der chemischen Zusammensetzung dem Sekundenkleber ähnelt (COOVER et al., 1959).

Da außerdem 1958 festgestellt wurde, dass sie die Gerinnungszeit verkürzen, wurden sie in Experimenten als Hämostatika getestet (SMITH, 1973).

In den 80er Jahren wurde außerdem monofiles, synthetisches und resorbierbares Nahtmaterial entwickelt, was sich durch eine noch höhere Reißfestigkeit kennzeichnete, ebenso durch einen verbesserten Gewebedurchzug (keine sägende Wirkung wie bei polyfilem Material) und einen erhöhten Infektionsschutz (keine Dochtwirkung mehr) (SCHUMPELICK, 2008).

Die Qualität der Naht und der Wundheilung wurde also auch durch Weiterentwicklungen des Nahtmaterials verbessert, ebenfalls bedeutend durch die Entstehung von atraumatischen Nadel-Fadenkombinationen (OSTERBERG und BLOMSTED, 1979) und außerdem durch die ständige Entwicklung neuer Nahttechniken (BÜRGER et al., 2000).

In den letzten Jahrzehnten wurden die natürlich vorkommenden Kleber ebenfalls immer weiter verbessert, aber auch immer mehr synthetische Klebstoffe entwickelt (SKEIST, 1962). Zum Einen aus dem starken Interesse Materialien für den nahtlosen Wundverschluss herzustellen (SMITH, 1973), aber auch für tausende Produkte im alltäglichen Leben. So sind Kleber bei Briefumschlägen, Briefmarken, Kartons, Autos etc. allgegenwärtig vorhanden (SKEIST, 1962) und nicht mehr wegzudenken.

In der Medizin sieht es ähnlich aus: seit der Entwicklung und Verwendung des Cyanoacrylates (50er Jahre) werden vermehrt auch andere synthetische Gewebekleber erforscht und stehen heute zur Verfügung (KESSLER und ZIMMERMANN, 1981).

1.4.3. Vor- und Nachteile des Gewebeklebers gegenüber dem mechanischer Wundverschluss

Der Gewebekleber spielt nicht nur eine wichtige Rolle in der Wundrandvereinigung, sondern auch bei der Sicherung von problematischen Nähten und bei der Hämostase von Wunden oder in Organen. Mittlerweile wird immer häufiger statt Nadel und Faden ein Gewebekleber eingesetzt, dies hat folgende Gründe:

Bei der Hautvereinigung mit Nadel und Faden, so wie es seit tausenden von Jahren praktiziert wird (s. Kapitel 1.4.2.), entstehen durch jeden Einstich der verwendeten Nadeln und Fäden Stichkanäle, die unschöne Narben nach der Wundheilung zurücklassen können. Durch die Herstellung von atraumatischen Nadel-Fadenkombinationen (OSTERBERG und BLOMSTED, 1979), konnte dieses Problem zwar vermindert, allerdings nicht vollständig behoben werden. Ein Gewebekleber kann die Wundränder ebenso wie eine Naht zusammenhalten, während hinterher eine (fast) narbenfreie Wunde zurückbleibt. Außerdem kann sensibles/ ästhetisches Gewebe (z.B. Gesichtshaut) durch ein Klebeverfahren geschont werden.

Es muss jedoch erwähnt werden, dass nur ein bestimmtes Ausmaß (Tiefe und Länge der Zusammenhangstrennung) einer Verletzung durch die Gewebeklebung wiedervereint werden kann. So sollte die Verletzung nicht älter als sechs Stunden alt und nicht länger als 5 cm sein. Zudem müssen tiefen Wunden subkutan vernäht werden, bevor die Haut geklebt wird (CATON-RICHARDS, 2011).

In den frühen Anfängen der Chirurgie wurden allerdings zunächst nur Klebstoffe verwendet, da die Menschen die Naht noch nicht kannten und zudem das technische Know-how nicht besaßen, um diese entsprechend durchzuführen. Daher half man sich mit Klebemitteln oder der so genannten Ameisennaht aus (SCHUMPELICK, 2008). Durch die fortschreitende Technisierung lässt sich in der Historie belegen, dass die Menschen bald herausfanden, dass genähte Wunden wunderbar zusammenhielten. So wurde dokumentiert und überliefert, dass die Ägypter bereits 3000 v. Chr. eine Öhrnadel benutzen. Das Nahtmaterial und die Nahttechniken haben sich in den letzten 5000 Jahren ständig weiterentwickelt, aber bedingt durch die Nachteile, die die Naht verursachen kann, ist die Suche nach einer schonenderen Gewebevereinigung vorangegangen (KESSLER und ZIMMERMANN, 1981; THOMAZINI-SANTOS et al., 2001).

Wie schon oben erwähnt, können die Narben der Stichkanäle durch die Benutzung von Gewebekleber verhindert werden. Weiterhin fällt auch die Lokalanästhesie weg, die beim Nähen der zu adaptierenden Wunde durchgeführt werden muss. Gerade bei Kindern löst sowohl die Verwendung von Kanülen zur Betäubung als auch die Nadeln zum Nähen Angst aus. Wenn die Wunde mit Gewebekleber vereint werden kann, entfällt diese Angst, ebenso die Sorge vor den Schmerzen beim Ziehen der Fäden (EBERHARD-METZGER, 1996).

Ein weiterer Vorteil des Klebeprozesses ist der Zeitaspekt – man spart Zeit und Geld im Gegensatz zum Nähen (GARDEZI et al., 1985).

Die Verwendung von Nahtmaterial zieht noch weitere Probleme nach sich. Bei zu starkem Zug des Fadens durch das Gewebe kommt es zur so genannten Sägewirkung und das Gewebe wird geschädigt (SCHUMPELICK, 2008). Außerdem stellen die gesetzten Knoten zum Sichern der Naht u.a. einen Fremdkörper dar und es kann zur Fremdkörperreaktion kommen (THOMAZINI-SANTOS et al., 2001). Zu fest gezogene Nähte können zu viel Druck auf das Gewebe ausüben, so dass daraus eine Mangel durchblutung und Wundheilungsstörungen resultieren können. Bis heute wird an Systemen gearbeitet, um die Nahtspannung zu messen. Bisher gibt es aber keine verlässliche Kontrolle dieser Spannung; sie kann vom Operateur nur subjektiv bewertet werden (SCHUMPELICK, 2008). Es gibt eine Fülle von unterschiedlichem Nahtmaterialien: polyfile (geflochtene) Fäden haben z.B. die schlechte Eigenschaft Flüssigkeiten zu absorbieren und zu quellen. So entsteht eine Dochtwirkung und es können Keime über den Faden in die Wunde wandern. Daher wird bei infizierten Wunden monofiler Faden empfohlen (BUCKNALL, 1981). Schon 1920 wurden verschiedene Voraussetzungen an eine ideale Naht gestellt, die selbst bis heute von modernstem Nahtmaterial kaum umzusetzen sind: die ideale Naht soll die Wundränder ausreichend zusammenhalten, verschwinden, wenn sie ihre Arbeit getan hat, soll frei sein von Infektionen und die Wundheilung nicht negativ beeinflussen (BUCKNALL, 1981).

Die Verwendung von Klammern stellt eine Alternative zur Naht dar. Hier liegt der Vorteil gegenüber dem Nähen ebenfalls wie bei den Gewebeklebern in der Zeit – und Geldersparnis. Allerdings muss auch hier eine Betäubung der Wunde und nach Abheilung und Entstehung einer Narbe die Entfernung der Klammern durchgeführt werden.

Zusammenfassend hat Caton-Richards in ihrer Veröffentlichung (2011) die wichtigsten Vorteile des Gewebeklebers gegenüber dem mechanischen Wundverschluss auf den Punkt gebracht: durch fehlende Stichkanäle und weniger Entzündungen bietet die Verwendung von Klebern eine gewisse Sicherheit. Da keine Narkose/ Lokalanästhesie, keine Vorbereitung der Naht oder Klammern nötig sind, zeichnet sich die Behandlung mit Gewebekleber durch Schnelligkeit und einen Zeitersparnis aus. Außerdem erleiden Kinder und Angstpatienten weniger Leiden, da weniger Schmerzen entstehen als durch Nadel, Faden, Anästhesie und Fäden ziehen. Das kosmetische Ergebnis ist durch die fehlenden Stichkanäle mindestens so gut wie bei der Anwendung einer Naht, außerdem muss beachtet werden, dass nur ein erfahrener Arzt kosmetisch schön nähen kann. Als letzter Punkt können die niedrigen Kosten aufgeführt werden, da synthetischer Kleber günstiger ist als teures Nahtmaterial, die Kosten für die Narkose entfallen und die längere Arbeitszeit für das Nähen und Fäden Ziehen entfällt.

Von dem in der Arbeit getesteten, vollsynthetischen Gewebekleber wird im bestem Falle beim Einsatz der Wundrandadaptation erwartet, dass er im Gegensatz zur Naht und zu anderen auf dem Markt befindlichen Gewebeklebern, Zeit und Geld sparen kann, keine Narkose zur Betäubung nötig ist, unschöne Narben verhindert werden, die Infektiosität vermindert wird, er das Gewebe nicht negativ beeinflusst oder sogar schädigt, er das Gewebe ausreichend lange adaptiert, gute hämostatische Eigenschaften hat und alle Anforderungen an einen effektiven medizinischen Klebstoff erfüllt.

1.4.4. Zusammenfassende historische Entwicklung des Gewebeklebers

Die Geschichte des Gewebeklebers selbst geht aus einer langen Vorgeschichte hervor (DONCKERWOLKE et al., 1998). Kleber wurden schon in den historischen Zeiten sehr bedacht eingesetzt (SKEIST, 1962). Aus den Erfahrungen, die aus anderen klebenden Substanzen gezogen wurden, entstand die Idee, den Kleber auch anderweitig einzusetzen. So wurden z.B. Leinenstreifen mit klebrigen Stoffen bestrichen, um damit Wunden zusammen zuhalten oder auch als einfache Verbände zu gebrauchen (ASMUSSEN und SÖLLNER, 2000). Die Leinstreifen gelten als

Vorläufer der heutigen erhältlichen Wundstreifen (z.B. Sterigrab®, Trusetal Verbandstoffwerk, GmbH).

Erst Mitte des 18. Jahrhundert wurde die klebende Eigenschaft des Kautschuks entdeckt (PANTEL, 2001) und u.a. als wasserabweisendes Mittel verwendet (WETZEL, 1962).

Ein weiterer Meilenstein in der Geschichte der Medizin, Chirurgie und Technik war die Entdeckung des Blutkreislaufes durch William Harvey (1628) (DRÄGER und GILL, 1990) und das durch den Wiener Arzt Morawitz entwickelte Gerinnungsschema (1904). Bedingt durch Morawitz Erkenntnisse wurden die Forscher auf die Idee gebracht, physiologische Blutgerinnungskomponenten zur Blutstillung zu verwenden (SEIDL et al., 1982). Revolutionär waren 1909 die Erfahrungen, die Bergel machte. Er entdeckte das Fibrin (BERGEL, 1909), beschrieb es als Erster als Blutgerinnungsprotein, erkannte dessen Fähigkeit als biologischer Kleber und benutzte Fibrinpuder (gewonnen aus Pferde- und Rinderserum) als Hämostatikum. Bergel begriff, dass Fibrin eine wichtige Rolle bei der Wundheilung spielt, indem es wundheilungsfördernde Reize aussendet (Leukozyteneinwanderung, Fibroblastenbildung) (LERNER und BINUR, 1990), und dass damit die Heilungsvorgänge des Körpers nachgeahmt werden können (STEMBERGER und BLÜMEL, 1984).

Es werden also demnach seit über 100 Jahren nachweislich Experimente mit Fibrinkleber als Gewebekleber und Hämostatikum gemacht (EBERHARDT-METZGER, 1996). Die ersten klinischen Erfahrungen mit Gewebeklebern konnten allerdings erst in den 80ern getan werden und heute gehören sie zu den konventionellen Methoden in der Chirurgie (CARBON, 2001).

1915 stellten Grey und Harvey Fibrin aus Schafsblut her (HARVEY, 1916; HARVEY, 1918) und verwendeten es in Form von Fibrinplättchen bzw. Fibrintampons bei Blutungen an parenchymatösen Organen (SEIDL et al., 1982) und zur Behandlung von Hirnblutungen (GREY, 1915). Beide erkannten durch ihre Experimente, dass Fibrin resorbierbar ist, aber auch, dass heterologes Fibrin Fremdkörperreaktionen auslösen kann (STEMBERGER und BLÜMEL, 1984). Mitte der 40er Jahre hat die Arbeitsgruppe um Young et al. versucht mit Fibrinogen periphere Nerven zu vereinigen (YOUNG und MEDAWAR, 1940). 1943 wurde Fibrinogen bei Hauttransplantationen verwendet (TIDRICK und WARNER, 1944). Cronokite et al. (1944) berichteten zur gleichen Zeit wie Young et al. von erfolglosen Versuchen

Fibrinogen und Fibrin anzuwenden. Schuld war das Unwissen und das bis dahin unlösbare Problem, die Fibrinkomponenten in ausreichender Menge und Konzentration zu gewinnen (THOMAZINI-SANTOS, 2001). So brauchte man für eine genügend große Klebekraft de facto eine zu hohe Konzentration an Fibrin.

Es dauerte ein weiteres halbes Jahrhundert, bis es möglich war, den Klebeeffekt von Fibrin kommerziell zu nutzen (STEMBERGER und BLÜMEL, 1984).

1948 wurde der fibrinstabilisierende Faktor XIII von Laki und Lorand beschrieben (SEIDL et al., 1982), der in den 70er Jahren, neben der Herstellung von hochkonzentriertem Fibrinogen, rein dargestellt werden konnte (MATRAS et al., 1972). Der Fibrinkleber kam dadurch wieder in den Fokus der Forschung und Wissenschaft und konnte in vielen Studien z.B. bei Milzrupturen und Leberverletzungen nun erfolgreich angewendet werden (MARTINOWITZ und SPOTNITZ, 1997). Spangler et al. begannen 1976 den biologischen Gewebekleber in der Herzchirurgie zu verwenden. Auch bei orthopädischen Fragestellungen (BOSCH et al., 1977) oder bei Hauttransplantationen (SPANGLER et al., 1973) stellte sich der Fibrinkleber als nützlich heraus.

Fibrinkleber ist deshalb so gut einsetzbar, weil er auf physiologischem Wege die letzte Stufe der Blutgerinnung nachahmt (LERNER und BINUR, 1990). Bedingt durch diese Fähigkeit kann der Kleber als Hämostatikum, zum Verschluss von Wunden oder zur Unterstützung der Wundheilung eingesetzt werden (SPOTNITZ et al., 1997). Bis 1982 wurden über 400 Arbeiten in verschiedensten Bereichen über Fibrinkleber angefertigt (CANONICO, 2003) (z.B. zur Blutstillung (PAULSON et al., 2000; NUR et al., 2005), in der plastischen Chirurgie (MATSUMOTO, 1968), Herz- und Thoraxchirurgie (TODA et al., 2007), Allgemeinchirurgie, Leberchirurgie (DAVIDSON et al., 2000; BERREVOET und de HEMPTINNE, 2007), Gynäkologie, Urologie, Orthopädie, Kieferchirurgie, Augenheilkunde etc.. Bis 2000 waren es über 2500 Veröffentlichungen (BÜRGER et al., 2000), und 2003 sogar über 3000 (CANONICO, 2003); Tendenz weiterhin steigend.

1978 war ein Fibrinkleber zum ersten Mal durch den Hersteller Immuno kommerziell erhältlich. Behring (Beriplast®, Behring, Deutschland) folgte Immuno (Tissucol®, Immuno, Österreich) und beide Firmen sind bis heute die zwei wichtigsten Anbieter von Fibrinklebern (EBERHARD-METZGER, 1996). Von Ethicon (Deutschland) wird zurzeit Quixil®, ein Fibrinkleber ohne bovines Eiweiß (Aprotinin, kann zu allergischen Reaktionen führen), vertrieben.

Heutzutage kann Fibrinkleber in über 400 Anwendungsgebieten eingesetzt werden, was zur Folge hat, dass der Kleber momentan 3-4 Millionen Mal pro Jahr auf der ganzen Welt verwendet wird, vor allem zur Kontrolle von lokalen Blutungen (auch laparoskopisch: DRUCKREY-FISKAAEN et al., 2007), bei der Wundversiegelung, zur Förderung der Wundheilung und zur Vereinigung von Geweben.

Eine Weiterentwicklung im Gebiet der Fibrinklebung ist die vliesgebundene Fibrinklebung. Diese kann auch bei großflächigen Blutungen, wie z.B. bei Leber- oder Milzresektionen (BRIELER et al., 1986) intraoperativ angewendet werden. TachoSil® (Nycomed, Österreich, Nachfolger von TachoComb®), als Beispiel für Fibrin-Kollagen-Vliese, besteht aus einem mit Fibrinogen und Thrombin beschichteten Kollagenschwamm (TachoSil, Zürich, 2005), der sowohl trocken als auch feucht zur Anwendung kommen kann. Die Idee, Kollagen als Hämostatikum zu verwenden, lässt sich auf die Arbeiten von Köhnlein und Mergard (1972) zurückführen, die in ihren Versuchen Kollagen-Pulver zur lokalen Blutstillung einsetzten. In Verbindung mit Blut führt Kollagen zur Koagulation, da Kollagen zur Thrombozytenaggregation führt (SEIDL et al., 1982). TachoSil® kann direkt zur Hämostase, zum Abdichten von biliären Leckagen (TODA et al., 2007), zum Sichern von Anastomosen, als Adhäsionsprophylaxe (TachoSil, Zürich, 2005) oder in der Leberchirurgie (Abdeckung von Resektionsflächen) eingesetzt werden.

In den Jahren zwischen der Entdeckung von Bergel (1909) und der klinischen Anwendung des Fibrinklebers, lagen alle Hoffnungen bei der Entwicklung und Wirkung der Cyanoacrylate, die in den 50er Jahre eher zufällig von Coover et al. entdeckt wurden (MATSUMOTO et al., 1967) und als erstes von der Firma Eastman Kodak als Eastman 910 Kleber (Methyl-2-Cyanoacrylat) (FISCHL, 1962) vertrieben wurde. Unter Cyanoacrylaten versteht man flüssige, monomere Verbindungen, die bei Raumtemperatur (COOVER et al., 1959), in kürzester Zeit bei Kontakt mit Wassermolekülen (HARRIS und TEBBY, 1986) unter einer exothermen Reaktion polymerisieren (ASMUSSEN und SÖLLNER, 2000). Durch die Polymerisation entsteht eine Verbindung, die eine hohe Klebekraft und Haftfestigkeit aufweist (GIEBEL et al., 1981). Da außerdem 1958 festgestellt wurde, dass sie die Gerinnungszeit verkürzen, wurden sie in Experimenten als Hämostatika getestet (SMITH, 1973).

Seitdem die Firma B. Braun 1968 Histoacryl® als klebende Alternative zur Naht auf den Markt gebracht hat, wird der synthetische Kleber erfolgreich zur

Wundvereinigung (SIMHON et al., 2004) mit guter Klebekraft, aber auch zum Verschließen von Ösophagusvarizen eingesetzt.

In zahlreichen Studien hat sich, trotz des beliebten Histoacryleinsatzes, herausgestellt, dass Cyanoacrylate durch eine schlechte Gewebeverträglichkeit charakterisiert sind, entzündliche Reaktion verursachen (SMITH, 1973), histotoxisch sind (HEISTERKAMP et al., 1970), Fremdkörperreaktionen auslösen können (LERNER und BINUR, 1990) und daher nur zu den oben genannten Anwendungen zugelassen sind (Wundverschluss (JALLALI et al., 2004), Ösophageus (Varizenverschluss) (DUNCAN et al., 2004)).

Methyl-2-Cyanoacrylate wurden aus diesem Grund von vielen Experimentatoren bald nach der Entdeckung des Cyanoacrylates durch Isobutyl- und Butyl-Monomere ersetzt (KESSLER und ZIMMERMANN, 1981), da sich herausstellte, dass sich die höheren Homologen weniger toxisch verhalten (SMITH, 1973).

Das heute noch auf dem Markt befindliche Histoacryl® besteht aus n-Butyl-2-Cyanoacrylat, ist u.a. für die die Klebung glatter und frischer Hautwunden (nicht in der Wunde kleben) (s.o.) zugelassen.

1966 wurde von Falb und Cooper GFR (Gelatine-Resorcin-Aldehyd-Klebstoff) entwickelt, da in diesem Vorteile gegenüber den Acrylaten gesehen wurden (DONKERWOLCKE et al., 1998). GFR wurde in Tierversuchen (TATOOLES und BRAUNWALD, 1966; KOEHNLEIN und LEMPERLE, 1969) als Gewebekleber und als Hämostatikum (BRAUNWALD et al., 1966) getestet. Die Gelatine, als tierisches Protein und mit chemischer Ähnlichkeit zum Bindegewebe, wird mit Resorcinol und Formaldehyd verbunden, da Resorcinol in Verbindung mit Formaldehyd schnell ein Polymer bildet (TATOOLES und BRAUNWALD, 1966) und somit eine starke Verbindung zwischen der Gelatine und Gewebe hergestellt werden kann (BONCHEK und BRAUNWALD, 1962). Wasserstoffbrücken zwischen der vernetzten Gelatine und dem Gewebe bewirken die Klebewirkung (TATOOLES und BRAUNWALD, 1966). Da Formaldehyd allerdings nicht gewebeverträglich ist (MATSUMOTO, 1968; TODA et al, 2007), wurde versucht, dies durch Glutaraldehyd zu ersetzen und die Toxizität des Produktes zu senken (BONCHEK und BRAUNWALD, 1962). Gelatine-Resorcinol-Aldehyde haben sich jedoch wegen ihrer schlechten Bioabbaubarkeit und der nicht ausreichenden Klebestärke nicht durchgesetzt.

Weitere Beispiele von Cyanoacrylatgewebeklebern sind der folgenden Tabelle (Tab. 1) zu entnehmen:

Handelsname	Cyanoacrylat	Firma	Abbaubarkeit	Einsatzgebiet
Omnex®	2-Octyl-Cyanoacrylat Butyl-Lactoyl-Cyanoacrylat	Ethicon, Deutschland	resorbierbar	gefäßchirurgische Eingriffe; Anastomosen
VetGlue®	Methoxypropyl-Cyanoacrylat	B.Braun Deutschland	resorbierbar	zugelassen im Vet.med.-Bereich für Zierfische, Vögel, Terrarientiere und Kleinnager
VETLOC®xcel	n-Butylcyanacrylat	Henkel Corporations, Deutschland	nicht resorbierbar	zugelassen im Vet.med.-Bereich
TruGlue	Ethyl-2-Cyanoacrylat	Trusetal Verbandstoffwerk GmbH, Deutschland	nicht resorbierbar	Hautkleber
Dermabond®	2-Octylcyanoacrylat	Ethicon, Deutschland	nicht resorbierbar	Hautkleber

Tab. 1: Beispiele einiger Gewebekleber auf Cyanoacrylatbasis

Neben den auf dem Markt befindlichen Fibrinklebern und Cyanoacrylaten gibt es eine Reihe von anderen Hämostatika oder Hilfen zum Wundverschluss, die auf biologischen Materialien basieren. Der Vollständigkeit halber hier einige Substanzen:

- auf Basis von Gelatine: Surgiflo® (resorbierbare hämostatische Matrix aus porciner Gelatine, Ethicon, Norderstedt, Deutschland); Spongostan® (porciner hämostatisch wirkender Gelatineschwamm, Ethicon, Norderstedt, Deutschland)
- auf Basis von Kollagen: GENTA-COLLresorb® (Kollagen-Gentamicin-Schwamm, zur Hämostase und antibiotischen Infektionsschutz, Resorba, Nürnberg, Deutschland)
- auf Basis von oxidierte Zellulose: Tabotamp® (resorbierbare Gazestreifen aus oxidierte, regenerierte Zellulose, Ethicon, Norderstedt, Deutschland)
- auf Basis von Protein-Aldehyd-Systemen: BioGlue® (Wundverschluss + Hämostase durch Albumin-Glutaraldehyd-Kleber, Bioform Medical, Oosterhout, Niederlande)
- auf Basis von Chitosanen: HemCon®, Chitoflex®, Celox®
- auf Basis von Zeolith: Quickclot® (Granulat, getestet von U.S. Army)

In den letzten Jahrzehnten wurden die natürlich vorkommenden Kleber immer weiter verbessert, aber auch immer mehr synthetische Klebstoffe entwickelt, die nun zur Verfügung stehen (SKEIST, 1962; KESSLER und ZIMMERMANN, 1981), v. a. wegen dem starken Interesse an Materialien für den nahtlosen Wundverschluss (SMITH, 1973).

In der Literatur werden keine vollsynthetischen, nicht acrylhaltigen, hämostatischen und wundverschließenden Klebstoffe beschrieben.

1.5. Allgemeines zum neuen Kleber K1

1.5.1. Material

Bei dem in der vorliegenden Arbeit zu testenden Material handelt es sich um einen Gewebeklebstoff der Firma Bayer MaterialScience AG auf Basis eines aliphatischen Polyurethans. Hierbei handelt es sich um ein Zweikomponentensystem, bestehend aus einem Polyurethanprepolymer und einem aminischen Härter, das nach Mischen der beiden Komponenten innerhalb von 30 Sekunden bis zwei Minuten einen Klebstoff bildet, der auch auf nassem Untergrund klebt.

Der Klebstoff ist transparent und hat eine Viskosität ähnlich dünnflüssigem Honig, und wird mittels einer Mischspritze und zwei zur Verfügung stehenden Aufsätzen angewendet (Zwei-Komponentenkleber, s. Abb. 1).

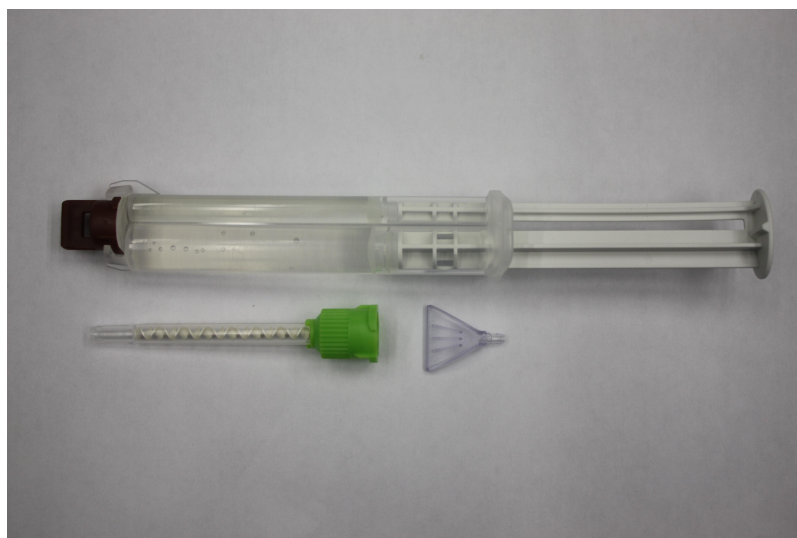


Abb. 1: K1 der Firma MedMix (Schweiz) in vorgefertigter Mischspritze

1.5.2. Vorversuche

In einem ersten Versuch (durchgeführt von der Bayer MaterialScience AG) wurde Muskelgewebe miteinander verklebt. Dazu wurde eine dünne Schicht Klebstoff mit einer exakten Dosierung auf das Gewebe aufgetragen und die Streifen überlappend miteinander verklebt. Zwei Minuten später hafteten beide Muskelstücke fest aneinander.

Nach der Aushärtung wurde das zusammengehaltene Muskelstreifenpaket in eine Zugprüfmaschine eingespannt. Damit konnte die Kraft gemessen werden, die nötig war, um die geklebten Stücke wieder auseinander zu reißen. In allen Fällen kam es zu einem Riss im Gewebe, nicht jedoch in der Klebeschicht. Der neue Klebstoff hält also besser als die Muskelfasern selber. Außerdem ist das Material dehnbar und flexibel.

Die Firma Bayer MaterialScience AG, die den Gewebekleber K1 entwickelt hat, hat im Vorfeld Studien zur Zellzytotoxizität dieser Substanz durchgeführt (Bayer-Forschungsmagazin „research“, 2008) und nachgewiesen, dass der neue Kleber bioverträglich ist (Messungen gemäß DIN EN ISO 10993) und dass er *in-vitro* keine mutagene oder reizende Wirkungen aufgewiesen hat. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Wundheilung nicht negativ beeinflusst wird, sondern, dass die an der Wundheilung beteiligten Zellen (wie Keratinozyten, Fibroblasten und Melanozyten) das neue Material nicht meiden, sondern an ihm entlang wachsen.

1.6. Auswahl des Tiermodells

Bei der Auswahl des *in-vivo* Modells haben wir uns für die Ratte und ein Leberresektionsmodell entschieden, da in der internationalen Literatur überwiegend über Versuche an Ratten berichtet wird und somit eine Vergleichbarkeit gegeben ist. Jakob et al. haben schon 1984 ein biodegradierbares Kollagen an einem Leberschaden getestet. Hierzu wurde an einem Rattenmodell ein Leberdefekt von 10 mm Durchmesser und 2 mm Tiefe in den linken Leberlappen gestanzt, um die blutende Wunde anschließend mit der Testsubstanz zu versorgen. Im Jahre 2005 wurde ein Paper in „European Surgical Research“ publiziert (NUR et al., 2005), in dem ein neuer Fibrinkleber überprüft wurde. Die Leberresektion wurde an einem Kaninchenmodell durchgeführt, wobei ein 40 x 4 mm großes Leberstück mit einer

gebogenen Schere am Leberlappenrand entfernt wurde. 2007 haben Biondo-Simoes et al. ebenfalls ein Leberresektionsmodell an der Ratte zur Testung einer neuen hämostatischen Agens veröffentlicht: mit einer Skalpellklinge wurde in dieser Arbeit ein 1 cm großes Eckstück des linken Leberlappens in einem Schnitt entfernt und die blutende Fläche mit dem zu testenden Kleber behandelt. Ähnlich gingen 2008 auch Demirel et al. vor. Die Arbeitsgruppe untersuchte die Leberregeneration und Blutstillung der Leber beim Einsatz von Fibrin im Vergleich zur Naht am Resektionsmodell an der Ratte und schnitt ungefähr 1 cm der linken Leberlappenecke mit einem Skalpell ab, was ca. 4 % des Lebergewichtes entsprach (ähnliches Vorgehen wie bei KALAYCI et al., 2010). Xiumei et al. haben 2010 ebenfalls einen Zwei-Komponenten Gewebekleber *in-vitro* und *in-vivo* untersucht und ca. 1 cm einer Leberecke entfernt, um anschließend den zu testenden Gewebekleber auf die blutende Leberschnittfläche auftragen zu können.

1.7. Die Ratte als Versuchstier – kurzer historischer Abriss

Zu wissenschaftlichen Zwecken werden jedes Jahr über 500.000 Ratten in Deutschland verwendet und stellen somit ein Viertel aller Versuchstiere dar. Nur Mäuse werden noch häufiger eingesetzt (über 1,8 Mio.) (TIERSCHUTZBERICHT, 2011).

Von den weltweit über 60 Rattenarten stammt die heutige Laborratte fast ausschließlich von der Wanderratte (*Rattus norvegicus*) ab. Diese war früher in Ostasien beheimatet und verbreitete sich, begünstigt durch Verkehrsmittel wie z.B. die Schifffahrt, weltweit. So kam die Ratte als so genannte „Schiffsratte“ im 18. Jahrhundert nach Mitteleuropa.

Anfang des 19. Jahrhunderts kam es in England zu einer Rattenplage und die Menschen fingen an, die Ratten in Wettkämpfen gegen Terrier kämpfen zu lassen (www.planet-wissen.de/natur_technik/tier_und_mensch/ratten.index.jsp). 1861 lag der Weltrekord eines Terriers bei 25 tot gebissenen Ratten in einer Minute. Das sportliche Ereignis wurde zum Erfolg und es wurden immer mehr Ratten gefangen, wobei von Zeit zu Zeit eine Albinoratte dabei war, die das Interesse auf eine ganze andere Art und Weise auf sich zog. Diese Ratten wurden nicht bei Wettkämpfen eingesetzt, sondern ausgestellt und weitergezüchtet. Forscher waren zu dem Zeitpunkt schon länger auf der Suche nach einer Methode Medikamente,

chirurgische Eingriffe o.ä. für den Einsatz am Menschen zu testen und wurden auf die Albinoratte aufmerksam. So gelangte die Wanderratte Mitte des 19. Jahrhunderts über die Zuchten der Aussteller oder andere Händler in die Labore.

1906 begann das Wistar-Institut in Philadelphia/ USA die ersten systematischen Zuchten durchzuführen, wodurch die heute häufig verwendete Wistarratte entstand (www.wistar.org/history). Bis heute gibt es mehr als 450 genetisch definierte Laborvarianten der Ratte, die das Resultat verschiedener Zuchtziele, wie Fruchtbarkeit, Anfälligkeit für Infektionen, Stressresistenz usw. sind (WEISS et al., 2003).

Die Ratte als Versuchstier wird besonders deswegen so gerne und oft verwendet, weil sie sehr fruchtbar ist, in kurzer Zeit eine hohe Nachkommenzahl aufweist, die Zucht und Haltung unproblematisch ist und für die Labore einfacher zu halten und zu handhaben sind als größere Versuchstiere. Zudem sind die Kosten z.B. der Anschaffung, der Haltung und des Futters geringer als bei größeren Tieren. Ein weiterer essentieller Punkt ist, dass die Ratte dem Menschen ähnliche physiologische Eigenschaften zeigt und sich daher für verschiedenste Eingriffe und Versuche gut eignet.

1.8. Eigene Fragestellung/ Zielsetzung

Mit dieser Arbeit soll ein neuer, vollsynthetischer Gewebekleber auf Polyurethanbasis durch eine biologische Sicherheitsprüfung (nach dem MPG) anhand einer tierexperimentellen Studie (Leberresektionsmodell an der Ratte) *in-vivo* untersucht werden – nachdem eine erfolgreiche biologische Verträglichkeitsprüfung auf Grundlage der DIN EN ISO 10993 *in-vitro* vorangegangen ist. Zusätzlich soll *in-vivo* die „non-inferiority“ des neuen Klebers im Vergleich zur anerkannten Standardtherapie (Fibrinkleber (Beriplast®) und Histoacryl®) gezeigt werden.

Dafür sollen zusammenfassend folgende Fragen mit Durchführung der Arbeit geklärt werden:

- wie ist die Handhabung des neuen Klebers,
- welche Vor- und Nachteile besitzt der neue Kleber, und welche Vor- und Nachteile entstehen gegenüber den anderen zwei getesteten Gewebeklebern,
- wie verhält sich der Kleber bei der Blutstillung, beim Verschluss von blutenden Wunden/ als lokales Hämostyptikum,
- wie hoch ist der Blutverlust bei dem vorliegenden Resektionsmodell,
- wie lange ist die Blutungszeit und entstehen durch die Anwendung Veränderungen der gemessenen Laborparameter,
- wie gestaltet sich die postoperative intraabdominale Adhäsion,
- wie sieht die anschließende Histologie, wie die Wirkung des Klebers auf das Gewebe/ die Leber (Fremdkörperreaktion?) aus.
- wird der neue Kleber den Forderungen an einen empfehlenswerten Kleber gerecht,
- lässt sich die „non-inferiority“, also die „Nicht-Überlegenheit“ = Gleichwertigkeit des neuen Gewebeklebers im Vergleich zur anerkannten Standardtherapie (Fibrinkleber und Histoacryl®) belegen?

Der neue Kleber ist bisher hinsichtlich seines Hämostase- und Klebeverhaltens, der Gewebeverträglichkeit und der Abbaubarkeit *in-vivo* noch nicht getestet worden. In Vorversuchen wurde lediglich die Bioverträglichkeit (gemäß DIN EN ISO 10993) gezeigt und dient als Grundlage für diese *in-vivo*-Studie.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

Die Versuche wurden an männlichen Ratten (Auszuchtstamm „Wistar“, Firma Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) durchgeführt.

Die Tiere waren zu Versuchsbeginn 10 Wochen alt und wogen zirka 300g.

Zur Akklimation wurden die Ratten eine Woche vor Versuchsbeginn geliefert und in Gruppen zu je 5 Tieren in Käfigen (Typ 2000, Tecniplast, Buguggiate, Italien) untergebracht. Pellets als Alleinfuttermittel (Ssniff V1534/300, Fa. Ssniff, Soest, Deutschland) und Wasser (wöchentlicher Wechsel, Nippeltränke) standen den Tieren ad libitum zur Verfügung.

Die Käfige waren mit Weichholzfasern (3-4S, JRS Lignocel, Holzmühle, Deutschland) eingestreut und wurden einmal pro Woche gereinigt.

Die Raumtemperatur betrug 21°C, bei einer 15-18fachen Luftwechselrate pro Stunde mit Hepa-gefilterter Luft (Hepa Stufe H13) und einer relativen Luftfeuchtigkeit von $50 \pm 10 \%$.

Ein automatisches Beleuchtungsprogramm erzeugte einen Tag-Nacht-Rhythmus, indem es einen Wechsel zwischen Hell- und Dunkelphasen von jeweils 12 Stunden veranlasste, wobei die Intensität in der Helligkeitsphase im Käfig 150 Lux erreichte.

Die Tiere wurden als spf -Tiere (spezifiziert pathogen frei) geliefert und im Institut für Versuchstierkunde, Med.-Fakultät der RWTH Aachen, in Barrierehaltung untergebracht. Das bedeutet, dass der Tierraum einer personenlimitierten Zutrittskontrolle mit speziellen hygienischen Schutzmaßnahmen (Tragen von Kittel, Mundschutz, Haube und Handschuhen sowie Überziehschuhen und Desinfektion) unterlag. Der Gesundheitsstatus der verwendeten Ratten entsprach den Empfehlungen für die Gesundheitsüberwachung von Labornagern und -kaninchen gemäß FELASA.

2.2. Versuchsplan

Die *in-vivo* -Testung des neuen Gewebeklebers (im Folgenden K1 genannt) bestand aus einem operativem Teil, der die Leberteilresektion und Labordiagnostik

beinhaltete, sowie der Organentnahme und erneuten Labordiagnostik und der sich anschließenden histologischen Untersuchung der Kleber-Gewebestelle.

Die Versuche fanden innerhalb eines Zeitraumes von 6 Monaten statt.

An den narkotisierten Wistarratten wurde eine definierte Leberresektion von ca. 1 cm² (Wundfläche) durchgeführt. Unmittelbar nach der Resektion wurde je nach Gruppe der neue Gewebekleber K1, Fibrinkleber (Beriplast®, CSL Behring GmbH, Hamburg, Deutschland) oder Histoacryl® (Braun, Melsungen, Deutschland) auf die Schnittfläche aufgebracht, um die Blutung zu stoppen.

Die Blutungszeit und Blutmenge, die Erythrozytenkonzentration, die Hämoglobinkonzentration, die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) gehörten zu den zu messenden Parametern ebenso wie die Leberenzyme AST (Asparat-Aminotransferase) und ALT (Alanin-Aminotransferase).

Die Gewebeverträglichkeit und Regeneration der Leber nach Klebung wurde nach 7 bzw. 21 Tage analysiert. Zielparameter waren hier v. a. die intraabdominale Adhäsion und Zellinfiltration im Resektionsgebiet (Histologie).

Das Versuchsvorhaben wurde am 23.05.2008 vom LANUV (Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz, NRW) mit dem AZ 8.87-50.10.35.08.105 genehmigt.

2.3. Gruppeneinteilung

Für das Leberresektionsmodell wurden 36 Ratten randomisiert in drei Gruppen aufgeteilt. Die Gruppeneinteilung ist der Abbildung 2 zu entnehmen.

Die erste Gruppe stellt die K1-Gruppe dar, in der der neue, zu testende Gewebekleber benutzt wurde.

Die zweite Gruppe entspricht der Fibrinklebergergruppe. Hier wurde im Vergleich zu K1 (Gruppe 1) Fibrinkleber verwendet, ebenso wie bei Gruppe drei, wo Histoacryl benutzt wurde.

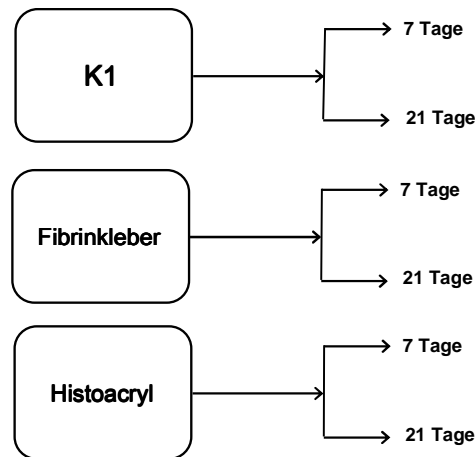


Abb. 2: Gruppeneinteilung der Versuchstiere in die K1- Versuchsgruppe, die Fibrinkleber- und Histoacrylgruppe, aufgeteilt nach zwei Überlebenszeitpunkten à 6 Tieren

2.4. Versuchsdurchführung

Am Tag der Operation wurden die Tiere randomisiert einer der unter 2.3 aufgeführten Gruppen eingeteilt.

Alle Ratten wurden vor dem Versuch einer kurzen Adspektion unterzogen, um sicherzustellen, dass nur klinisch gesunde Tiere für das Tierversuchsvorhaben genutzt wurden.

Zur Dokumentation des ersten Versuchsabschnittes wurde jeder operierten Ratte eine Versuchsnummer vergeben, die sich wie folgt zusammenstellte:

z.B. W1-A-01, W3-B-36

W1, W3, W4 W= Woitok 1= K1, 3= Fibrinkleber, 4= Histoacryl

A, B A= 7 Tage, B= 21 Tage

01 - 36 01-36 = Tiernummer in chronologischer Reihenfolge

2.4.1. Narkose

Präoperativ wurde als Schmerzmittel 1 ml Buprenorphin 0,1 mg/kg s.c. (Temgesic®, Essex Pharma GmbH, München, Deutschland) verabreicht.

Alle Operationen wurden in Inhalationsnarkose mit 1,5 – 2,0 Vol % Isofluran (Forene, Firma Abbot GmbH, Wiesbaden, Deutschland) + 1L O₂/ Min. und unter Spontanatmung durchgeführt.

Zur Anästhesieeinleitung wurden die Ratten in eine durchsichtige Narkosebox gesetzt, die mit dem System des Narkosegerätes (Eickemeyer Isofluran Vapor, Tuttlingen, Deutschland) verbunden war. Nach Einsetzen der Ratte in die Kammer, wurde diese ca. 5 Minuten lang mit 5 Vol % Isofluran beflutet, um eine möglichst schnelle Einleitung zu gewährleisten.

Sobald das Tier das Narkosestadium III erreicht hatte und damit ausreichend tief in Narkose lag, konnte es gewogen werden, bevor es anschließend auf den Operationstisch gelegt und zur Narkoseerhaltung mit Hilfe einer Kopfkammer ein 1,5-2,0 Vol % Isofluran-Sauerstoffgemisch zugeführt wurde.

2.4.2. Lagerung, Vorbereitung

Nach erfolgreicher Narkoseeinleitung, wie unter 2.4.1. beschrieben und Schmerzmedikation mit Buprenorphin 0,1mg/kg (Temgesic®, Essex Pharma GmbH, München, Deutschland), wurde die Wistar ratte in Rückenlage auf einer speziell angefertigten Magnetwärmematte fixiert. Dazu wurden alle 4 Extremitäten mittels Klebeband auf der Wärmematte angebracht.

Im Anschluss wurde das Operationsfeld (Abdomen, s. Abb. 3 Bild A) rasiert und mit Braunoderm® (Braun, Melsungen, Deutschland) desinfiziert.

2.4.3. Operatives Vorgehen

Für die Operationen wurden chirurgische Instrumente der Firma Aesculap, Tuttlingen und Firma Medicon, Tuttlingen (Deutschland) verwendet.

Die Leberresektion wurde wie folgt durchgeführt (Abbildung 4 stellt den Operationsverlauf photographisch dar):

Nachdem das Tier wie unter 2.4.2. beschrieben vorbereitet wurde, erfolgt die chirurgische Eröffnung des Bauchraumes (mediane Laparotomie) mittels Schere vom kranialen Beckenrand bis zum Xiphoid. Die Wundränder wurden mit Hilfe von Haken, die magnetisch mit der Unterlage verbunden waren, fixiert.

Für die späteren Blutuntersuchungen wurde 1 ml Blut benötigt, das noch vor der Leberresektion aus der Vena cava caudalis entnommen wurde. Dafür wurde das Darmkonvolut nach links verlagert mit einer in 0,9 %igen Kochsalzlösung getränkten

Kompresse bedeckt, um es vor Austrocknung zu schützen und mittels einer 1 ml Spritze und einer 27G Kanüle das Blut gewonnen.

Nach Blutstillung und Rückverlagerung des Darmes in das Abdomen wurde als nächstes die Leber dargestellt. Um späteren eventuellen Blutverlust messen zu können, wurde ein gewogener Tupfer (3 x 3cm) unter den linken lateralen Leberlappen (s. Abb. 3 und 4B) gelegt. .

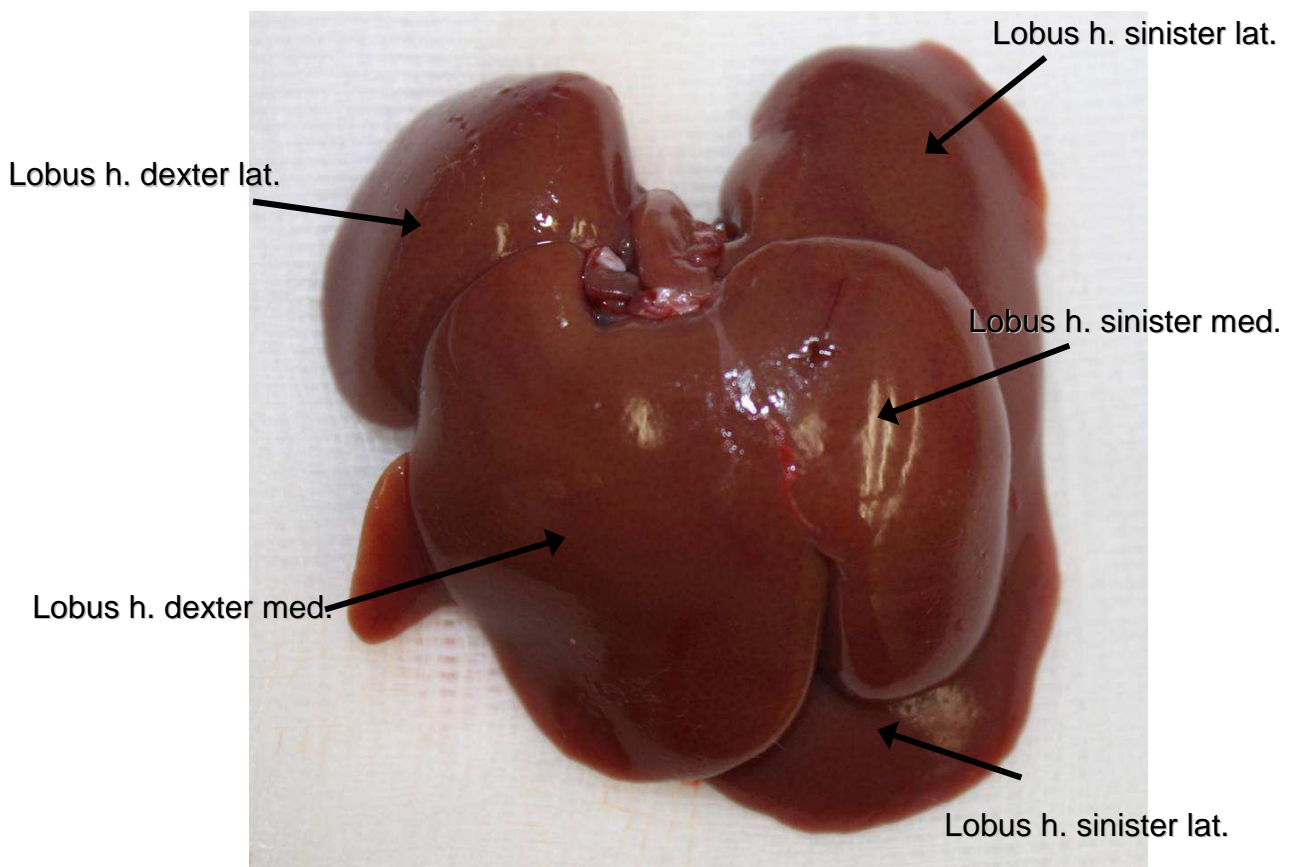


Abb. 3: Fotografische Darstellung der Facies diaphragmatica

Mit einer geraden Schere wurde dann ein ca. 1cm² großes Teilstück dieses Leberlappens reseziert und anschließend gewogen.

Direkt nach der Resektion wurde je nach Gruppe der Gewebekleber K1, Fibrinkleber (Berioplast®, CSL Behring GmbH, Hamburg, Deutschland) oder Histoacryl® (Braun, Melsungen, Deutschland) auf die Schnittfläche aufgetragen, um mit Hilfe der Kleber die Blutung zu stoppen. Hierbei wurde einerseits die Zeit zwischen Schnitt und Kleberauftragung gemessen sowie von Schnitt bis zur Blutstillung und die Zeitspanne vom Zeitpunkt der Kleberauftragung bis zur vollständigen Blutstillung.

Nachdem die Blutung erfolgreich gestoppt werden konnte, wurde jedes Tier noch für ungefähr 10 Minuten in Vollnarkose beobachtet. Wenn nach dieser Zeitspanne die Schnittfläche weiterhin trocken blieb, konnte die Leber reponiert und das Abdomen in zwei Schichten verschlossen werden. Dazu wurde die Muskelschicht fortlaufend und die Haut mit einfachen Einzelheften mit resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl®, 4-0 USP, Fa. Ethicon, Norderstedt, Deutschland) vernäht.

Im Anschluss an die Operation wurde die Ratte mit einem wasserfesten Stift am Schwanz markiert, um sie am Finaltag eindeutig zuordnen zu können, und zum Aufwachen in eine Aufwachbox (Vetario Intensive-Care Unit) gelegt.

Jeder Eingriff dauerte ca. 1,5 Stunden einschließlich Vor- und Nachbereitung.

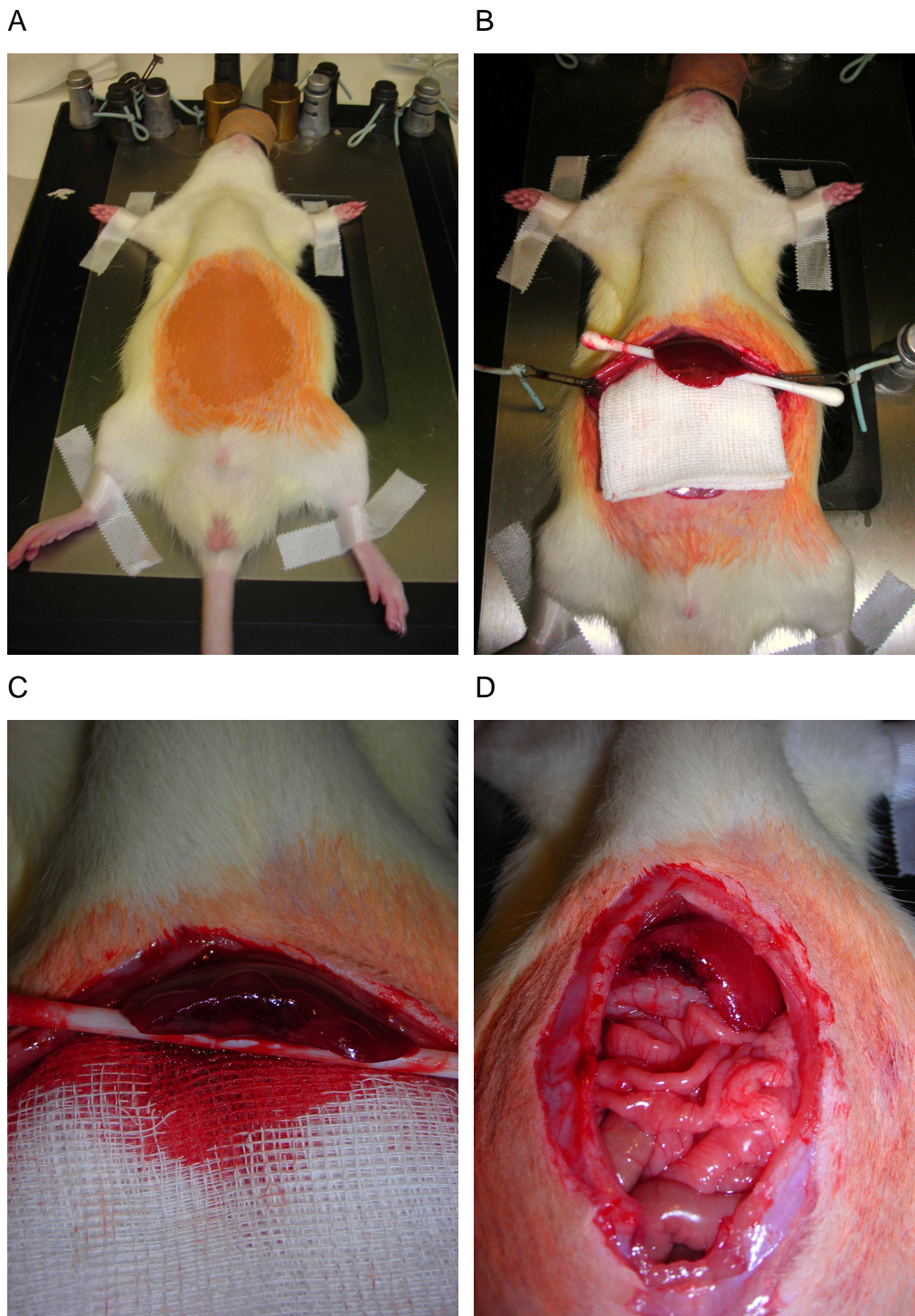


Abb. 4: Fotografische Darstellung des Versuchsablaufes (A Vorbereitung/Lagerung, B Darstellung der Leber, C Leberresektion nach Kleberauftragung, D Reponierung der mit Gewebekleber behandelten Leber)

2.4.4. Postoperative Nachsorge

Nachdem die Tiere in der Aufwachbox aus der Narkose aufgewacht waren und ein physiologisches Verhalten (z.B. waren aufmerksam, aktiv, zeigten Futter- und Tränkeaufnahme, Putzverhalten etc.) zeigten, wurden sie wieder in den Käfig zu den anderen Ratten gesetzt und hatten direkt Zugang zu Futter und Wasser.

Je nach Gruppeneinteilung wurden die Tiere ein bis zwei Mal täglich über einen Zeitraum von 7 bzw. 21 Tagen durch Mitarbeiter des Versuches beobachtet, um bei eventuellen Komplikationen (z.B. bei abnehmendem Körpergewicht, schlechtem Allgemeinbefinden, abnormalem Sozialverhalten, klinischen Auffälligkeiten, offensichtlichen Schmerzen und Leiden) eingreifen zu können und um im berechtigten Falle den Versuch zu beenden und das Tier erlösen zu können.

2.4.5. Versuchsende

Die Versuchstiere wurden nach den zwei definierten Zeiträumen erneut mittels Inhalationsnarkose (wie unter 2.4.1. beschrieben) anästhesiert und für die Organentnahme vorbereitet.

Die Blutprobe, zur Bestimmung der Blutparameter, wurde ebenfalls wieder aus der Vena cava caudalis entnommen, zuvor wurde die Gewebeverträglichkeit (makroskopische Beurteilung und Einteilung der Adhäsion in drei Gruppen) analysiert und photographisch (Coolpix, L3, Nikon, Düsseldorf, Deutschland) festgehalten.

Ohne aus der Narkose zu erwachen wurden die Tiere anschließend durch Entbluten (Eröffnung großer Gefäße und des Zwerchfells) euthanasiert und die Leber als vollständiges Organ entnommen.

Um den Tieren unnötige Schmerzen, Leiden und Schäden zu ersparen, wurden folgende Abbruchkriterien festgelegt, um bei Auftreten dieser Kriterien das Versuchsende dementsprechend vorzuziehen und die Tiere zu euthanasieren.

Sollte die Atemfrequenz sichtbar erhöht (> 150 /Minute) sein, oder Dyspnoe auftreten; die Tiere struppiges und ungepflegtes Fell aufweisen, die Augenlider geschlossen sein, oder eine abnorme Körperhaltung auffallen; oder ist die Ratte nicht in der Lage aufzustehen bzw. sich fortzubewegen, oder die Futter- und Wasseraufnahme scheint erschwert/ nicht möglich, ein deutlicher Gewichtsverlust sichtbar sein; dann sollte als

Resultat der Gesamtbeurteilung das Tier vor Versuchsende aus dem Versuch genommen werden und vorzeitig euthanasiert werden.

Die Abbruchkriterien lehnen sich an die „Empfehlung des Arbeitskreises Berliner Tierschutzbeauftragter für die vorzeitige Tötung erheblich leidender Versuchstiere“ (http://www.charite.de/tierschutz/download/Abbruchkriterien-Berliner-TSchB_2Auflage2009.pdf) an.

2.4.6. Messparameter

Am ersten Operationstag wurden folgende Parameter bestimmt:

- Gewicht der Ratte
- Blutungszeit in Sekunden: Schnitt-Kleberauftragung
 Schnitt-Blutstillung
 Kleber-Blutstillung
- Blutungsmenge in Gramm: Tupfergewicht vorher
 Tupfergewicht nachher
- reseziertes Leberstück in Gramm
- Blutparameter: Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, Leukozyten,
 Thrombozyten, aPTT, AST, ALT

Am Finaltag wurden folgende weitere Parameter bestimmt:

- Gewicht der Ratte
- Intraabdominale Adhäsion: semiquantitativ eingeteilt in mild, moderate und severe
- Lebergewicht in Gramm
- Blutparameter: Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, Leukozyten,
 Thrombozyten, aPTT, AST, ALT

2.4.7. Labordiagnostik

Zur Bestimmung der unter 2.4.6. aufgeführten Blutparameter wurden am OP-Tag und am Finaltag jeweils 1 ml Blut benötigt. Die Analyse der Blutwerte wurde im instituteigenen Labor durchgeführt.

Für die Bestimmung der Erythrozyten und des Hämoglobins wurden 0,2 ml Blut in ein EDTA-Röhrchen (EDTA KE/1.3, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) gefüllt und im Anschluss an den Versuch/ das Finale direkt gemessen. Mit dem Blutanalysegerät Celltac α (Nihon Kohden Europe GmbH, Kleinmachnow, Deutschland) wurde aus dem Vollblut (0,2ml EDTA KE/1.3, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) der Hämoglobingehalt (Hb), die Erythrozytenkonzentration (Erys) und zusätzlich der Hämatokrit (Hkt) sowie die Anzahl der Leukozyten und Thrombozyten bestimmt.

Um die Leberparameter AST und ALT bestimmen zu können, wurde Serum benötigt und daher 0,3 ml Blut in ein Serumröhrchen (Serum Gel S/1.1, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) gegeben, das 10 Minuten lang bei 7500G zentrifugiert (Rotina 420R, Hettich, Tuttlingen, Deutschland) wurde. Das so gewonnene Serum wurde anschließend abpipetiert und in kleinere Eppendorf-Cups umgefüllt und bis zur Untersuchung in einem Gefrierschrank (Bosch, Stuttgart, Deutschland) bei -18 °C aufbewahrt. Die Messung der Leberwerte wurde mittels Vitros System 250 Chemistry (Ortho Clinical Diagnostics, a Johnson-Johnson Company, Neckargemünd, Deutschland) durchgeführt.

Um die aPTT bestimmen zu können, mussten Citratröhrchen (Coagulation, 3ml Monovette®, Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) verwendet werden, die mit 0,45 ml Blut befüllt wurden und ebenfalls für 15 Minuten bei 1500G zentrifugiert wurden. Der Gerinnungsparameter aPTT wurde mithilfe eines halbautomatischen Analysengerätes für Clottings-Test (Amelung, KC 4A Micro, Deutschland) bestimmt.

2.4.8. Gewebeaufbereitung

Nach Beurteilung und Entnahme der Leber erfolgte die Fixierung eines unbehandelten, nativen Stückes und des Teiles mit der Kleber-/Gewebestelle in gepuffertem, 10 %igem Formalin (pH 7,4).

2.4.9. Histologie

Die histologische Bearbeitung der Gewebeproben wurde im Labor der Chirurgischen Klinik des Uniklinikums der RWTH Aachen durchgeführt.

An den fixierten Leberstücken erfolgte eine Dehydrierung (mittels Gewebeentwässerungsautomat, Tissue-Tek, V.I.P., E150/E300 series, Firma: Sakura, CA, USA) sowie die Einbettung in Paraffin und Anfertigung von 2-5 µm dicken Schnitten (Schnittdicke abhängig von jeweiliger Färbung) von jedem Präparat, wobei darauf geachtet wurde, dass besonders die Leber-/ Kleberzone bzw. die Gewebe-/ Kleberzone gut dargestellt wurde. Analog dazu wurden auch Schnitte von der nativen Leber ohne Verletzung zum Vergleich angefertigt.

Die Schnitte wurden zur histologischen Auswertung mittels Hämatoxylin & Eosin (H.E.), Sirius Red (zur Auswertung des Kollagen I/III-Quotienten) und mit verschiedenen Antikörpern (Immunhistologie: Expression von TUNEL, Ki67, CD68, COX-2 und MPO) angefärbt.

2.4.9.1. H.E.-Färbung

Die H.E.-Färbung stellt eine typische Routine- und Übersichtsfärbung der Schnitte in der Histologie dar.

Zunächst wurden 2-3 µm dicke Schnitte von jeder Probe mit einem Mikrotom (Hn 40, Reichert-Jung, Heidelberg, Deutschland) angefertigt.

Zum Entparaffinisieren wurden die Schnitte für 40 Minuten bei 60°C im Brutschrank erwärmt, damit sie anschließend für 10 Minuten mit Xylol behandelt wurden. Es folgte eine absteigende Alkoholreihe (100 %, 100%, 96%; 70 %; je 5-6 Mal in jeder Stufe schwenken) und eine Waschung mit destilliertem Wasser.

Im nächsten Schritt wurden die Schnitte für 3 Minuten in Hämalaunlösung (Firma Merck, Darmstadt, Deutschland) gefärbt, bevor sie danach 5 Minuten lang mit Leitungswasser gespült wurden.

Darauf folgte eine kurze Einstellung der Schnitte für 15 Sekunden in aktivierte (aktiviert mit Essigsäure) Eosin Färbelösung (Firma Merck, Darmstadt, Deutschland). Nach Abspülen mit destilliertem Wasser (Eosin ist wasserlöslich) wurden die gefärbten Schnitte einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 96%, 100%, 100 %, je 5-6 Mal in jeder Stufe schwenken) unterzogen, um die Schnitte vor dem Eindecken

wieder zu dehydrieren. Der letzte Schritt erfolgte ebenfalls mit Xylol, im Anschluss konnten die Präparate mit Vitro Clud (Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) eingedeckt und beurteilt werden.

Die Objektträger wurden zum Trocknen an der Raumluft (22°C) belassen und bis zur Betrachtung unter dem Lichtmikroskop bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

Die Zellkerne werden in der H.E. -Färbung durch Hämalaun blau dargestellt, das azidophile Zellplasma hingegen erscheint rot (durch Eosin, sauer).

2.4.9.2. Sirius Red-Färbung

Um den Kollagengehalt (und um 2 verschiedene Kollagentypen) bestimmen zu können, wurden von allen Proben 5 µm dicke Schnitte hergestellt, die wie bereits unter 2.4.9.1. beschrieben, entparaffinisiert wurden.

D.h. im ersten Schritt erfolgte eine Erwärmung der Schnitte für 40 Minuten bei 60°C im Brutschrank, damit sie anschließend für 10 Minuten mit Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 100%, 96% und 70%iger Alkohol; 5-6 Mal in jeder Stufe schwenken) behandelt werden konnten.

Nach Abspülen unter fließendem Wasser wurden die zu färbenden Schnitte in 0,1 %iger Sirius Red Färbelösung (Ansatz der Sirius Red Färbelösung: 0,2g Sirius Red (Polysciences, Inc., PA, USA) in 200 ml 1,2 %iger Pikrinsäure (Waldeck, Münster, Deutschland) lösen) für eine Stunde eingestellt.

Hinterher wurden die Schnitte für 2 Minuten in 0,01 N Salzsäure (Firma Merck, Darmstadt, Deutschland) getaucht und danach mit fließendem Wasser abgespült.

Ebenfalls wie bei H.E. -Färbung mussten die Schnitte vor dem Eindecken dehydriert werden und durchliefen daher eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 96%, 100% und 100% Alkohol: 5-6 Mal in jeder Stufe schwenken) und Xylol.

Da Sirius Red einen anionischen Farbstoff darstellt, färbt er aufgrund seiner Sulfonsäuregruppe die basischen Kollagenmoleküle an.

Mit Hilfe der Sirius Red Färbung ist es daher also möglich, Kollagen Typ I (das festere, spätere Kollagen, rote Färbung) und Kollagen Typ III (frühere Kollagen, grüne Färbung) darzustellen (mit dem Mikroskop, s. S. 46 und 2.5.1.) und somit zu unterscheiden.

2.4.9.3. Immunhistochemie

Zum Nachweis von antigenen Strukturen wird die Immunhistochemie verwendet.

Mit Hilfe einer Antigen-Antikörper-Reaktion und mit einer anschließenden Sichtbarmachung durch eine Farbstoffreaktion wurde dies verwirklicht.

Die immunhistologischen Untersuchungen wurde an in Paraffin eingebetteten Material (2 µm dicke Paraffin-Schnitte) mit der Avidin-Biotin-Dreischritt Methode (Methode mit indirektem Nachweis des Antigens) durchgeführt. Basis dieser Methode ist es, dass Avidin (Hühnereiweiß) eine hohe Affinität für Biotin aufweist.

Als erstes wurde ein unkonjugierter Primärantikörper verwendet, der sich gegen das jeweilige zu detektierende Antigen richtet. Um die gebundenen Primärantikörper zu markieren, wurden anschließend biotinylierte Sekundärantikörper benutzt. Danach konnte der Avidin-Biotin Enzymkomplex hinzugeben werden, der mit dem Sekundärantikörper reagiert. Als Substrat zur Farbentwicklung diente DAB (3,3 Diaminobenzidine tablets, Firma Sigma, Steinheim, Deutschland).

Von den in Paraffin eingebetteten Proben wurden je 2 µm dicke Schnitte hergestellt, die zunächst bei 37°C im Brutschrank entparaffinisiert wurden.

Eine endogene Peroxidase-Aktivität wurde geblockt, indem die Schnitte für 30 Minuten in 3 % H₂O₂ eingestellt und anschließend mit PBS (Phosphate Buffered Saline, PBS Dulbecco, 9,55g/L, Biochrome AG, Berlin, Deutschland) gewaschen wurden.

Sechs verschiedene primäre Antikörper kamen zum Einsatz (Einzelheiten s. u.):

die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Anschließend wurden die Proben mit PBS gespült und mit dem entsprechenden Sekundärantikörper bearbeitet und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuter Spülung der Proben wurden die Schnitte mit einem ABC-Kit (Vektor, USA) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und in DAB (3,3 Diaminobenzidine tablets, Firma Sigma, Steinheim, Deutschland) für 5 Minuten entwickelt. Durch mehrfaches Waschen mit Wasser wurden die Reste der Lösung entfernt. Als Gegenfärbung wurde zusätzlich eine Hämatoxylin-Färbung (Firma Merck, Darmstadt) durchgeführt.

Die quantitative Bestimmung der Antigen-Antikörper-Reaktion wurde mit einem Image Analyser System analysiert (Quantimet 600, Leica, Deutschland).

Als Negativkontrollen dienten die lediglich mit Sekundärantikörpern und ABC inkubierten Proben.

TUNEL-Färbung

TUNEL steht für "Terminale Desoxyribosyl-Transferase mediated d-UTP Nick End Labeling" und ermöglicht die Auswertung von apoptotischen Zellen (CLAVIEN et al., 2000), indem die während der Apoptose entstehenden DNA-Strangbrüche sichtbar gemacht werden. Die Methode basiert auf einer hohen Sensitivität: jede apoptotische Zelle kann identifiziert werden, auch schon in einer sehr frühen Phase der Apoptose (MIGHELIA und SCHIFFER, 1995).

Unter Apoptose versteht man den gengesteuerten, programmierten Zelltod (auch „Selbstmord“ der Zellen genannt), der vor allem der Zellzahlkontrolle dient und somit bei der physiologischen Entwicklung und Funktion des Organismus eine unentbehrliche Rolle spielt. Der Zelltod kann auch bei pathologischen Kontexten auftreten und spielt daher bei der Elimination von schädlichen Zellen eine essentielle Rolle (XIAO et al., 2003), und kann außerdem durch Immunzellen veranlasst werden. Wir haben die TUNEL-Auswertung nach Gavrieli et al. (1992) ausgesucht, um den Grad der hepatischen Schädigung beurteilen zu können (MIN et al., 2011) und um eine Aussage über die Qualität und das Ausmaß der entstehenden Reaktionszone treffen zu können.

Die TUNEL-Färbung erfolgte durch das „in-situ apoptosis detection kit“ (ApopTag Peroxidase Kit, Intergen, Oxford, UK). DAB wurde als Chromogen verwendet. Als Gegenfärbung wurde die Hämatoxylin-Färbung durchgeführt.

Ki67-Färbung

Mittels Ki67-Färbung wurden alle Zellen angefärbt, die sich aktiv im proliferativen Zellzyklus befanden (GERLACH et al., 1997; SCHOLZEN, 2000). Unter Ki67 versteht man ein großes, nukleäres Protein, das in allen aktiven Phasen des Zellzyklus (G1-, S-, G2- und M-Phasen) exprimiert wird und in der Phase G0 nicht nachweisbar ist. Somit stellt die Ki67-Untersuchung einen Proliferationsmarker dar.

Die Anfärbung der Schnitte erfolgte mittels monoklonalem Maus-Antikörper gegen Ki67 (MIB-5) (Firma Dako, Glostrup, Dänemark) mit einem Verdünnungsfaktor von 1:10. Davor wurden die Schnitte in der Mikrowelle bei 600 Watt für 3 mal 5 Minuten mit Citratpuffer (pH6) vorbehandelt. Als Sekundärantikörper kam ein biotinylierter

Kaninchen-Anti-Maus Antikörper (Polyclonal Rabbit, Anti Mouse Immunoglobulins/ Biotinylated Rabbit F (ab`)², Firma Dako, Glostrup, Dänemark) mit einer Verdünnung von 1:300 zur Anwendung. Als Gegenfärbung wurde die Hämatoxylin-Färbung durchgeführt.

CD68-Färbung

Unter CD68 versteht man ein hochgradig glykolysiertes Transmembranprotein, das vor allem in Lysosomen von myeloischen Vorläuferzellen vorhanden ist und außerdem von Gewebemakrophagen exprimiert wird (PULFORD et al., 1990). Daher dient die Untersuchung von CD68 als Entzündungsmarker.

Zur Färbung der 2 µm dicken Schnitte wurde ein monoklonaler Maus-Antikörper ED1 (DPC, Biermann, Bad Nauheim, Germany) mit einer Verdünnung von 1:100 verwendet; zuvor wurden die Schnitte bei 37°C für 10 Minuten mit Trysin vorbehandelt. Als Sekundärantikörper diente ein biotinylierter Kaninchen-Anti-Maus Antikörper (Firma Dako, Glostrup, Dänemark) in der Verdünnung von 1:300. Als Gegenfärbung wurde die Hämatoxylin-Färbung durchgeführt.

Cyclooxygenase-2 (COX-2)-Färbung

Wie die Cyclooxygenase-1 (COX-1), gehört COX-2 zu den Cyclooxygenasen, die eine wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen spielen. COX-1 wird konstitutiv von einer Mehrzahl von Zellen exprimiert, wo hingegen die Synthese von COX-2 von Entzündungsprozessen abhängt und einen regulatorischen Einfluss auf die Biosynthese von Prostaglandine, Thromboxanen etc. hat (EBERHART et al., 1994).

COX-2 wird als immunhistochemischer Indikator für die Makrophagenaktivierung verwendet und ist bei Nagetieren ein sicherer Marker für die Expression dieser Cyclooxygenase (GORDON, 2003) und wurde daher hier als Parameter ausgewählt.

Nachdem die Schnitte in der Mikrowelle bei 600 Watt für 3 mal 5 Minuten mit Citratpuffer (pH6) vorbehandelt wurden, wurde COX-2 mittels eines COX-2 – Primärantikörpers (COX-2 (SP21) monoklonaler Kaninchenantikörper, DCS, Hamburg, Deutschland) mit einem Verdünnungsfaktor von 1:100 (Firma Dako, Glostrup, Dänemark) angefärbt. Als sekundärer Antikörper wurde goat anti-rabbit (Polyclonal Goat Anti Rabbit Immunoglobulins/ Biotinylated, Firma Dako, Glostrup, Dänemark) mit einer Verdünnung von 1:300 angewendet.

Als Gegenfärbung wurde die Hämatoxylin-Färbung durchgeführt.

MPO-Färbung (Myeloperoxidase)

Myeloperoxidase (MPO) ist ein Enzym, das die Hauptkomponente der Granula von neutrophilen Granulozyten darstellt (AMANZADA et al., 2011) und durch Degranulation freigesetzt wird (LENZ et al., 2011). Aus diesem Grunde dient die MPO-Färbung als Indikator, um die Anreicherung von neutrophilen Granulozyten und deren Aktivierung zu bestimmen (HELEWSKI et al., 2011).

Nachdem die Schnitte in der Mikrowelle bei 600 Watt für 3 mal 5 Minuten mit Citratpuffer (pH6) vorbehandelt wurden, wurde zur Färbung der 2 µm dicken Schnitte ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper MPO (Abcam, Cambridge, Großbritannien) mit einer Verdünnung von 1:50 verwendet. Als sekundärer Antikörper wurde goat anti-rabbit in einer Verdünnung von 1:500 (Firma Dako, Glostrup, Dänemark) angewandt. Als Gegenfärbung wurde die Hämatoxylin-Färbung durchgeführt.

2.5. Auswertung**2.5.1. Mikroskopische Untersuchung**

Mithilfe der H.E.-Färbung sollte die hepatozelluläre Schädigung, die durch den Gewebekleber entstehen kann, quantifiziert werden, ebenso das Ausmaß des inflammatorischen Infiltrates. Dazu wurde histomorphologisch besonders eine Zone im Präparat im Detail beurteilt: die Reaktionszone zwischen der Leber und dem Gewebekleber (s. Abb. 5). Diese reaktive Zone liegt dem normalen Lebergewebe praktisch auf (als Reaktion auf den Gewebekleber) und ist sehr einfach durch das Auftreten von unterschiedlichen Zellen zu ermitteln und somit von den Leberzellen zu unterscheiden.

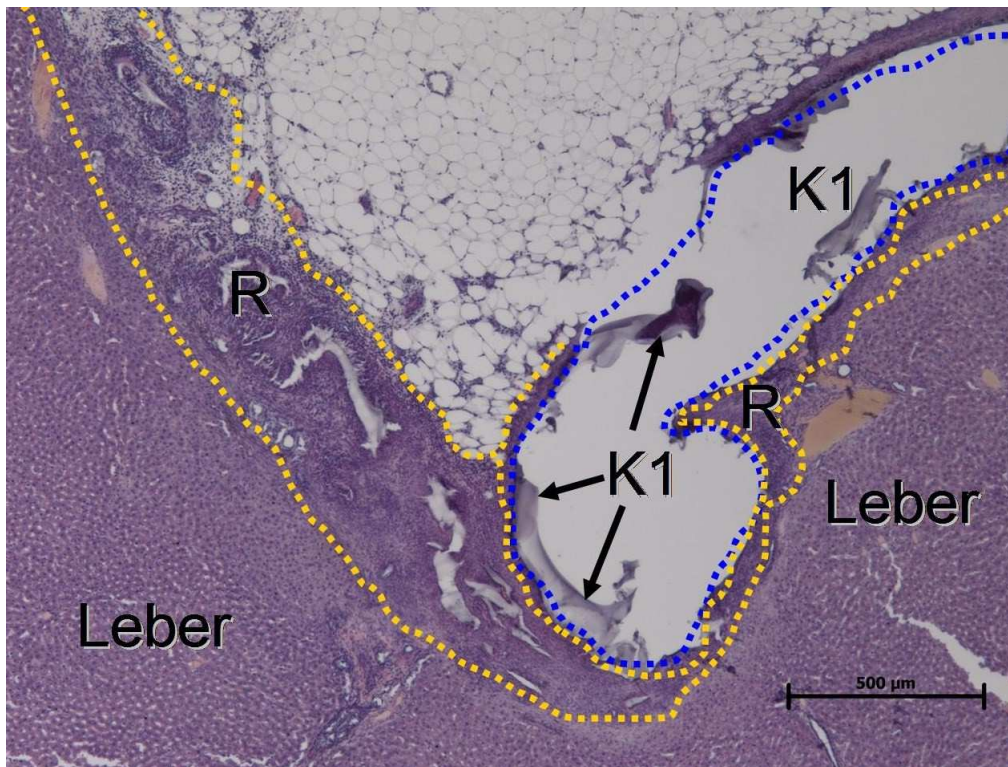


Abb. 5: Übersicht eines H.-E.-Präparates in der 5-fachen Vergrößerung mit Darstellung der Leber, der entstehenden Reaktionszone (R, eingegrenzt in gelb), der Kleberhöhle (in blau) mit Kleberresten von K1. Der Kleberhöhle liegen hier von außen Omentumreste auf.

Hierzu wurden die H.E.-Präparate zunächst mit einer 5-fachen Vergrößerung betrachtet (Leica DM2500, Wetzlar, Deutschland), um einen Überblick über den vorliegenden Schnitt zu erhalten. Anschließend wurde eine immer größer werdende Vergrößerung gewählt bis hin zur 400fachen Vergrößerung.

Zur Auswertung dieser Zonen wurde ein modifizierter Score nach TOVAR et al. (1998) angewandt. Pro Präparat wurde die zu untersuchende Zone (Reaktionszone), bei einer 400fachen Vergrößerung, in mindestens 5 Gesichtsfelder eingeteilt und auf verschiedene Parameter hin untersucht und ausgewertet (das Auftreten der Parameter) (s. Tab. 2).

	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Zone 4	Zone 5	MW
Zellzahl allgemein						
Bindegewebe (Fibroblasten,- und zytten)						
Blutgefäße (incl. Kapillaren)						
Mononukleäre Zellen (Makrophagen, Lymphozyten, Plasmazellen)						
Granulozyten						
Fremdkörperriesenzellen						
Nekrosen						
Granulome						

Tab. 2: Mikroskopische Auswertung der H.E.- Schnitte; Darstellung der Parameter, die in der Reaktionszone untersucht wurden

Jeder Parameter (das Auftreten/ Ausmaß des Parameters pro Zone) wurde mit 0 - 3 Punkten bewertet: 0 = nicht vorhanden/ vereinzelt, 1 = wenig, 2 = mittelmäßig, 3 = häufig. Danach wurde der Mittelwert der Zonen und für jedes einzelne Präparat ermittelt und die Mittelwerte in die einzelnen Klebertypgruppen und die 2 verschiedenen Überlebenszeitpunkte eingruppiert und ausgewertet. Anschließend konnten die errechneten Werte statistisch berechnet und beurteilt werden.

Zusätzlich zur Bestimmung eines Scores der einzelnen Parameter wurde die Breite der Leberreaktionszone bestimmt, d.h. in welchem Ausmaß/ Breite (in μm) die Leber mit dem verwendeten Gewebekleber reagiert hat. Dazu wurde in mindestens 10 Gesichtsfeldern bei 400facher Vergrößerung pro Präparat die Zone ab dem Leberrand gemessen und für jede Probe der Mittelwert bestimmt.

Die Auswertung der Sirius Red-Schnitte erfolgte mit Hilfe einer Olympus Kamera (Olympus C-3030, Hamburg, Deutschland), die an ein Olympus BX41 Lichtmikroskop angeschlossen war. Der Kollagen I/III-Quotient wurde nach einer modifizierten Methode nach Junquiera (JUNQUIERA und BRENTANI, 1979) ermittelt. Dazu müssen zwei Polarisationsfilter (Polarisator und Analysator) am Lichtmikroskop angebracht werden. Der Analysator wird 90° zum Polarisator gedreht, so dass eine so genannte „Kreuzpolarisation“ entsteht und kein Licht mehr hindurch gelassen wird, außer den durch die Farbmoleküle gedrehten Lichtwellen. Durch dieses Verfahren ist es möglich, Kollagen Typ I hellgrün – grün und den Kollagen Typ III rötlich darzustellen.

Pro Probe wurden mindestens drei repräsentative Bilder in 400facher Vergrößerung angefertigt und mittels Olympus DP-Soft 3.0 verarbeitet und archiviert. Anschließend konnten die Bilder mit Hilfe der Software ImageProPlus Version 3.0 (Media

Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA) analysiert und ausgewertet werden (s. Abb. 6).

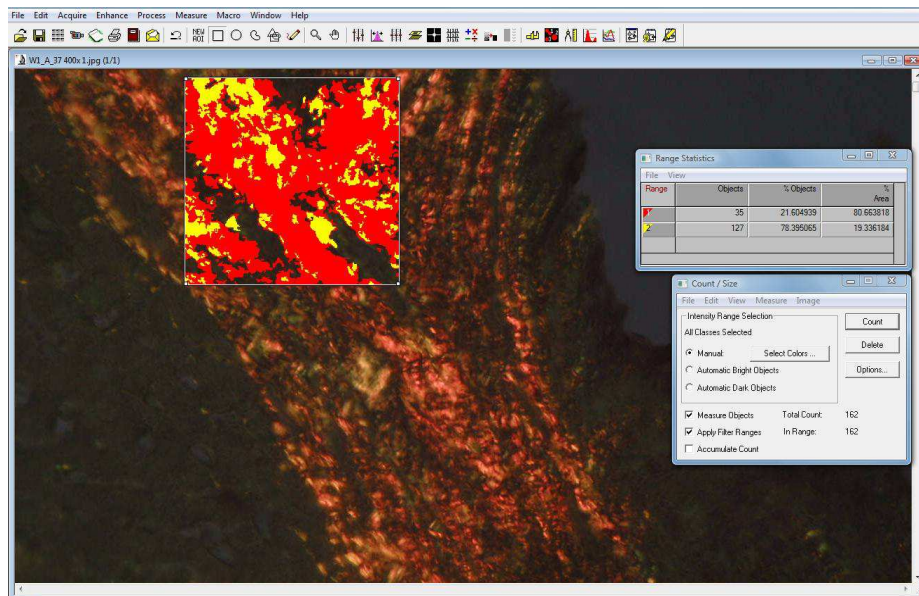


Abb. 6: Ermittlung des Kollagen Typ I/ III Quotienten mit der Software „Image-Pro Plus - Version 3.0“ (Media Cybernetics, Silver Springs, Maryland, USA)

Pro angefertigtem Bild erfolgte 5 Mal die Kollagenbestimmung innerhalb einer definierten AOI (area of interest) von 400 μm (s. Abb. 6). Innerhalb dieser AOI konnte mittels zweier vorgegebener Farbklassen der grünliche und rötliche Kollagenanteil analysiert werden. Abschließend wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet und der Kollagen I/III-Quotient durch Berechnung bestimmt.

Die Auswertung der Immunhistochemie wurde ebenfalls, wie bei der Sirius Red-Auswertung, mit Hilfe der Software ImageProPlus Version 3.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA) durchgeführt. Hierfür mussten mittels eines Lichtmikroskops (Leica DM2500, Wetzlar, Deutschland) von jedem Präparat mindestens 10 Bilder bei 400facher Vergrößerung angefertigt werden. Die Bilder wurden per Kamera (Kamera Leica DFC 420 C, Twain Version 6.12.10/ FxLib 5.0.4.30/ Firmware 1.8.0, Wetzlar, Deutschland) übertragen und unter Zuhilfenahme der Leica Software (Leica Application Suite V3.3.0, Wetzlar, Deutschland) verarbeitet und archiviert. Anschließend konnten die Fotos mit der Software ImageProPlus geöffnet und ausgewertet werden.

Positive Zellen stellen sich bei den verschiedenen Antikörperfärbungen braun dar, die negativen Zellen sind blau. Mithilfe der Software ImageProPlus wurden in jedem einzelnen Bild fünf AOI's bestimmt und die Gesamtzellzahl in der Zone ermittelt (s. Abb. 7), indem das Programm die gesamten Zellkerne rot anfärbt und auszählt. Die Zählung der positiven Zellen (braun gefärbt) erfolgte ohne Software, sondern durch einfaches, manuelles Auszählen (ein Mal). Anschließend konnten durch die beiden erfassten Angaben der prozentuelle Anteil der positiven Zellen im Verhältnis zur Gesamtzellzahl pro Präparat errechnet und statistisch ausgewertet werden.

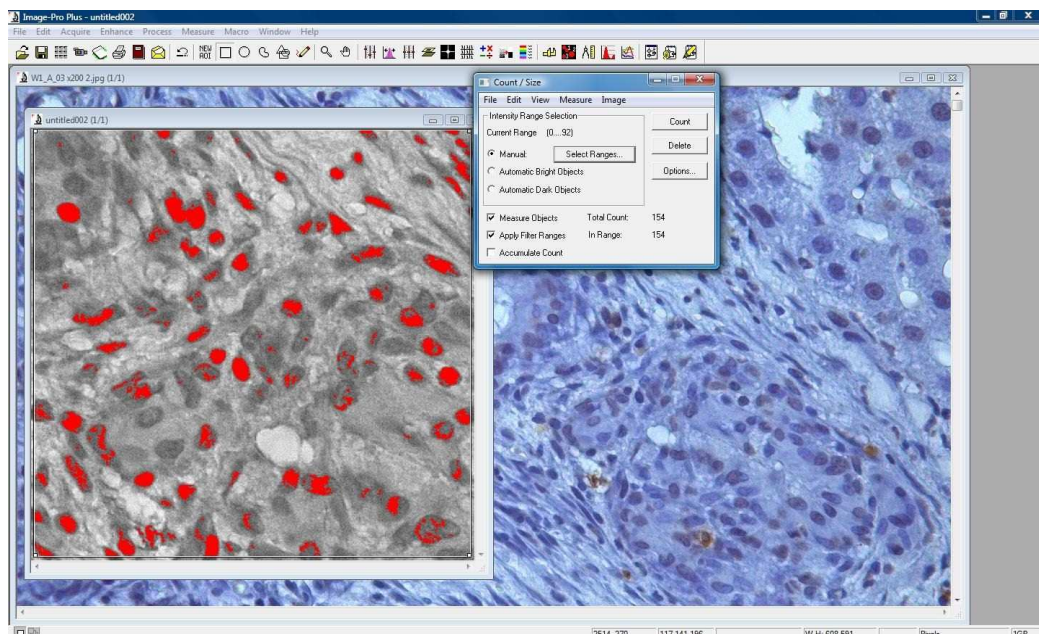


Abb. 7: Software „Image-Pro Plus – Version 3.0“ (Media Cybernetics, Silver Springs, Maryland, USA), Bestimmung der Gesamtzellzahl mithilfe der Software und anschließende manuelle Zählung der positiven Zellen, dann Bestimmung des prozentualen Anteils der positiven Zellen an der Gesamtzellzahl der immunhistochemischen Marker

2.6. Statistische Analyse

Für die statistische Auswertung wurden Mittelwert (MW), mittlerer Fehler des Mittelwertes (SEM = Standard Error of the Mean) und der Median berechnet.

$$MW = \frac{\sum X_i}{N}$$

$$SD = \left(\frac{\sum (X_i - MW)^2}{N - 1} \right)^{1/2}$$

$$SEM = \frac{SD}{\sqrt{N}}$$

Alle Berechnungen (mit Ausnahme der Statistik) wurden mit Hilfe elektronischer Datenverarbeitung unter Microsoft Windows Vista und der Tabellenkalkulation Excel für Windows Vista (Microsoft, Redmond, USA) durchgeführt.

Die statistische Auswertung und die Erstellung von Grafiken erfolgte mit dem Programm Graph Pad Prism 5 (Graph Pad, CA, USA).

Die stochastische Signifikanz oder Unterschiede zwischen mehreren Gruppen wurde mittels 1-way-ANOVA überprüft. Zuerst erfolgte der Bartlett's Test für Homogenität der Varianzen und danach als post hoc Test der Tukey-Kramer Test zum multiplen Vergleich.

Statistische Vergleiche zwischen nur zwei Gruppen (z.B. Gewichtsverlauf: 7 vs. 21 Tage) wurden mit einem paarigem Student t-Test durchgeführt.

Die Darstellung der Blutungszeit (Blutstillung), des Blutverlustes und der Breite der Reaktionszonen (H.E.-Färbung) erfolgte zur besseren Übersicht in Boxplots. Hier kennzeichnet die Box die mittleren 50% aller Werte. Die Box wird durch einen Balken geteilt, der den Median widerspiegelt. Der Beginn der Box wird durch die unteren 25% der Werte, und das Ende der Box durch die oberen 75% der Werte gekennzeichnet, die keine Ausreißer sind. Die Whisker veranschaulichen den Minimum- und Maximum-Wert des Datensatzes.

Unterschiede bei einem p-Wert < 0,05 wurden als signifikant angesehen.

Als Signifikanzgrenzen wurden gewählt:

$p \leq 0,001$	höchst signifikant	***
$p \leq 0,01$	hoch signifikant	**
$p \leq 0,05$	signifikant	*
$p > 0,05$	nicht signifikant	n.s.

3. Ergebnisse

in-vivo - Leberteilresektion

Die Ergebnisse der K1-Gruppe werden mit denen der Fibrinkleber, - und Histoacryl-Gruppe im Folgenden verglichen, da mit dieser Arbeit Erkenntnisse zu dem neu entwickelten, vollsynthetischen Gewebekleber K1 der Firma Bayer MaterialScience AG gewonnen werden sollen und die Auswertung der Messwerte und Parameter Hinweise auf die Wirkung, Nebenwirkung und Anwendung von K1 liefern sollten.

Es traten in keinem der zwei Versuchsabschnitte mit den drei Klebergruppen intra-, peri- oder postoperative Komplikationen auf. Alle Tiere überlebten und erholten sich gut (die definierten Abbruchkriterien, wie unter 2.4.5. „Versuchsende“ beschrieben, wurden nicht erreicht).

Insgesamt wurden 36 Ratten operiert. Die Tiere wurden randomisiert in 3 Klebergruppen zu je 2 Überlebenszeitpunkten eingeteilt (s. Abb. 8).

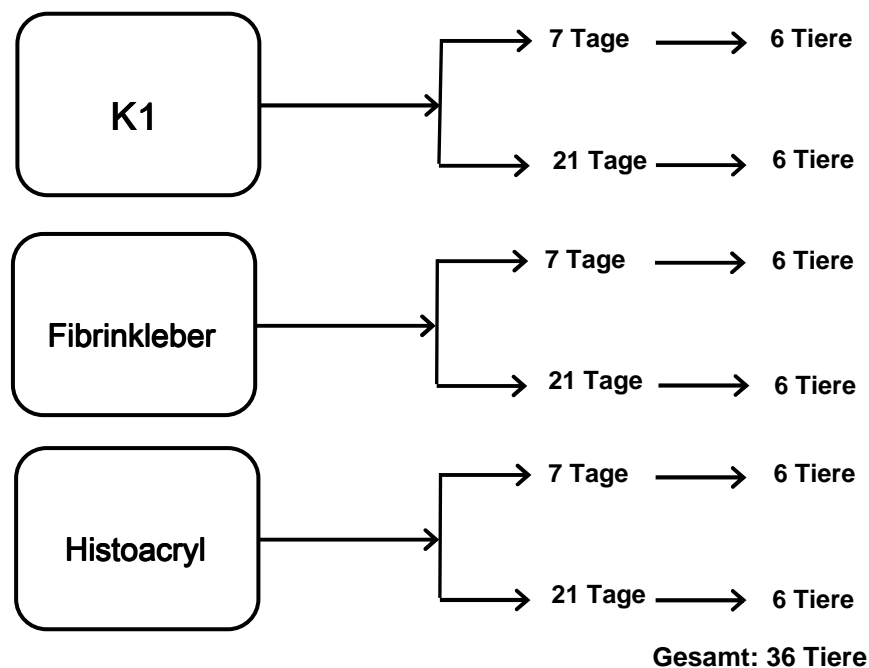


Abb. 8: Überblick über die verwendeten Tiere

3.1. Körpergewicht

Das Körpergewicht ist ein wichtiges Kriterium zur Beurteilung des Wohlbefindens der Versuchstiere und kann bei der Bewertung des Allgemeinzustandes eines Tieres nach einer OP eine große Rolle spielen und mitunter zum Abbruch des Versuches führen (s. unter Kapitel 2.4.5. Versuchsende). Da es sich bei den eingesetzten Tieren um juvenile Ratten handelte, wurde eine Gewichtszunahme erwartet.

Die Tiere aller Gruppen nahmen wie erwartet zwischen der Leberresektion und dem Versuchsende nach 7 bzw. 21 Tagen an Gewicht zu (vgl. Tab. 3).

Der Gewichtsverlauf innerhalb jeder Klebergruppe unterschied sich hinsichtlich des OP-Tages und dem Finaltag nach 7 Tagen nicht signifikant.

Die Gewichtszunahme zwischen Tag 0 und Tag 21 zeigte bei allen drei Gruppen einen signifikanten Verlauf ($p < 0,01$).

Im direkten Vergleich der drei Klebergruppen untereinander zeigten sich keine signifikanten Unterschiede nach 7 oder 21 Tagen. Die Gewichtsverläufe verliefen sehr ähnlich.

Da es sich bei den eingesetzten Tieren um juvenile Ratten handelte, wurde eine Gewichtszunahme, wie oben erwähnt, erwartet und somit auch bestätigt.

Gruppe		$\bar{x} \pm s$			Differenz	p-Wert	
		n	OP-Tag	Finaltag			
K1	7 Tage	6	313 ± 20	333 ± 30	$- 8 \pm 6$	n.s.: OP-Tag vs. Finaltag	n.s.: Differenz K1 vs. Fibrinkleber, Histoacryl 7 und 21 Tage
	21 Tage	6	253 ± 5	344 ± 12	91 ± 15	$p < 0,01$: OP-Tag vs. Finaltag	
Fibrinkleber	7 Tage	6	346 ± 11	366 ± 6	24 ± 9	n.s.: OP-Tag vs. Finaltag	
	21 Tage	6	298 ± 24	380 ± 18	83 ± 18	$p < 0,01$: OP-Tag vs. Finaltag	
Histoacryl	7 Tage	6	306 ± 12	347 ± 23	41 ± 20	n.s.: OP-Tag vs. Finaltag	
	21 Tage	6	333 ± 32	412 ± 29	78 ± 15	$p < 0,01$: OP-Tag vs. Finaltag	

Tab. 3: Zusammenfassende Auswertung des Gewichtsverlaufes aller Gruppen

n = Anzahl der ausgewerteten Tiere **x** = Mittelwert
s = SEM **Differenz** = Diff. zwischen Gewicht am Finaltag und am OP-Tag, innerhalb einer Klebergruppe, zu einem Zeitpunkt
n.s. = nicht signifikant ($= p > 0,05$)

3.2. Blutungszeit

Die Blutungszeit (Blutstillung) stellt einen der Parameter dar, der während der OP gemessen wurde, und setzt sich wie folgt zusammen:

- aus der Zeitspanne zwischen der Leberteilresektion, also dem Zeitpunkt, bei dem mit einer geraden Schere ein ca. 1 cm² großes Teilstück des linken Leberlappens reseziert wurde (vergleichbare Methoden in Literatur zu finden: BIONDO-SIMOES et al., 2007; DEMIREL et al., 2008),
- der Kleberauftragung
- und der anschließenden eintretenden Hämostase.

Da die Zeit zwischen Schnitt und Kleberauftragung variiert hat und schwer vergleichbar ist, wurde zur Auswertung der Blutstillung die Zeitspanne zwischen Kleberauftragung und der endgültigen Blutstillung verwendet (s. Abb. 9, rot markiert). Ein vergleichbare Datenerhebung lehnt sich an die Literatur an (SCHWARTZ et al., 2002; NUR et al., 2005), da so die Blutungszeit genauer bestimmt werden konnte.

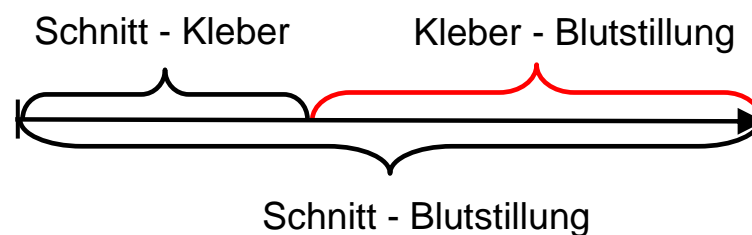


Abb. 9: Zeitablauf zur Bestimmung der Blutungszeit

Außerdem wurde bei diesem Messparameter die Gruppeneinteilung in zwei Überlebenszeitpunkte vernachlässigt, da dies zum Zeitpunkt der Klebung keinen Einfluss auf die Messwerte hatte. So ergab sich eine Tieranzahl von 12 pro Gruppe. Aus unterschiedlichen Gründen (Kleber z.B. verlaufen, musste neu appliziert werden; oder durch dicke Kleberschicht Zeitpunkt der Blutstillung nicht eindeutig bestimmbar) mussten sowohl bei der K1-Gruppe als auch bei der Fibrinklebergruppe Tiere aus der Wertung genommen werden, da die Blutungszeit nicht vernünftig bestimmt werden konnte.

Die Blutungszeit wurde durch die Art des Klebers bestimmt und aufgrund dessen werden im Folgenden die Ergebnisse der Zeitspannen der einzelnen drei Klebergruppen (K1, Fibrinkleber und Histoacryl) analysiert.

Die durchschnittlichen Blutungszeiten (in Sekunden) sind der Abbildung 10 als Boxplots zu entnehmen.

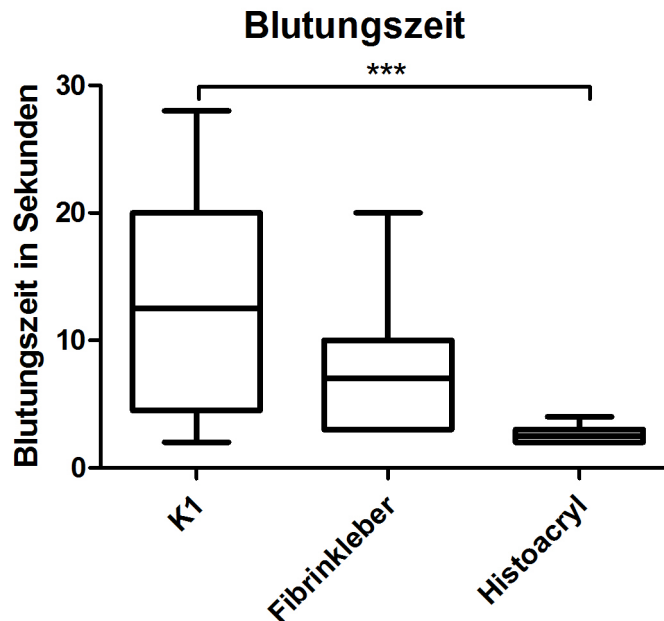


Abb. 10: Darstellung der intraoperativen Blutungszeit nach Leberteilresektion, eingeteilt in die K1-, Fibrinkleber- und Histoacrylgruppe, als Boxplot (***: $p < 0,001$ bei K1 vs. Histoacryl; $p \geq 0,05$ bei K1 vs. Fibrinkleber und Fibrinkleber vs. Histoacryl)

Box	= mittlere 50% der Daten	Mittlerer Balken	= Median
Box Anfang	= unteren 25% der Daten	Box Ende	= ob. 75% d. Daten
Whisker	= begrenzten Minimum- und Maximum- Werte		

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass K1 am längsten brauchte, um die Blutstillung der Resektionswunde zu unterstützen und unterschied sich somit höchst signifikant von den Tieren, die mit Histoacryl behandelt wurden. Zwischen den anderen Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (s. Abb. 10 und Tab. 4).

Gruppe	Blutungszeit in Sekunden (Kleber-Blutstillung)						p-Wert
	n	x	s	Median	Min	Max	
K1	10	12,8	2,7	12,5	2	28	*** $p < 0,001$: vs. Histoacryl, n.s vs. Fibrin
Fibrinkleber	9	7,3	1,9	7,0	3	20	n.s.: vs. K1; Histoacryl
Histoacryl	12	2,7	0,2	2,5	2	4	*** $p < 0,001$: vs. K1; n.s.: vs. Fibrinkleber

Tab. 4: Auswertung der intraoperativen Blutungszeit (in sec.) nach Leberteilresektion, eingeteilt in die Klebergruppen

n = Anzahl der ausgewerteten Tiere
s = SEM

x = Mittelwert
n.s.= nicht signifikant (= $p > 0,05$)

3.3. Blutverlust

Um die spätere bei der Leberresektion verloren gegangene Blutmenge zu erfassen und um die Menge wiegen zu können, wurde nach Eröffnung der Bauchhöhle und Vorlagerung des linken Leberlappens ein gewogener Tupfer (3 x 3 cm) unter diesen gelegt. Nach erfolgreicher Blutstillung wurde 10 Minuten abgewartet, um den Kleber aushärten und wirken zu lassen, aber auch um die Blutstillung beobachten und bei Komplikationen eingreifen zu können. Da es nicht möglich war, nur das Blut der entstandenen Blutung aufzufangen, wurden zum Teil auch Kleberreste und Bauchhöhlenflüssigkeit mit gemessen. Da dies aber bei jedem Tier der Versuchsdurchführung der Fall war, kann davon ausgegangen werden, dass sich der gleiche Fehler für jede gemessene Blutmenge ergibt (systematischer Fehler) und somit bei der Auswertung vernachlässigt werden kann. Diese Datenerhebung lehnt sich aus Vergleichsgründen auch an die Literatur an (SCHWARTZ et al., 2004; DAVIDSON et al., 2000; TURNER et al., 2002).

Wie schon bei der Blutungszeit (s. 3.2.) wurde bei der gemessenen Blutmenge bei der Analyse der Ergebnisse auf die Gruppeneinteilung nach Überlebenszeit verzichtet, da dieser Parameter keinen Einfluss auf den entstehenden Blutverlust hatte. Somit konnten 36 Tiere eingesetzt werden, es erfolgte jedoch die übliche Einteilung der Klebertypen in drei Gruppen.

Die Darstellung des Blutverlustes (in Gramm) ist in Abbildung 11 als Boxplot dargestellt.

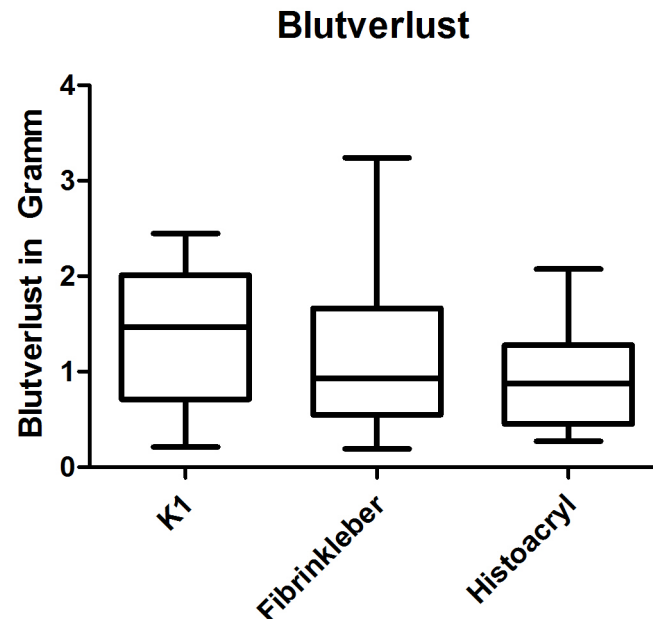


Abb. 11: Darstellung des intraoperativen Blutverlustes nach Leberteilresektion, eingeteilt in die K1-, Fibrinkleber- und Histoacrylgruppe, als Boxplot (n.s.: $p > 0,05$ bei K1 vs. Fibrinkleber, K1 vs. Histoacryl und Fibrinkleber vs. Histoacryl)

Box = mittlere 50% der Daten Mittlerer Balken = Median
 Box Anfang = unteren 25% der Daten Box Ende = ob. 75% d. Daten
 Whisker = begrenzten Minimum- und Maximum- Werte

Die verlorene Blutmenge der K1-Gruppe unterschied sich nicht signifikant im Vergleich zur gemessenen Menge der Fibrinkleber- und Histoacrylgruppe (s. Abb. 11 und Tab. 5).

Gruppe	Blutverlust in g						p-Wert
	n	x	s	Median	Min	Max	
K1	12	1,337	0,215	1,464	0,213	2,447	n.s.: vs. Fibrinkleber; Histoacryl
Fibrinkleber	11	1,169	0,255	0,933	0,191	3,241	n.s.: vs. K1; Histoacryl
Histoacryl	12	0,913	0,157	0,880	0,270	2,074	n.s.: vs. K1; Fibrinkleber

Tab. 5: Auswertung des intraoperativen Blutverlustes (in g) nach Leberteilresektion, eingeteilt in die drei Klebergruppen

n = Anzahl der ausgewerteten Tiere x = Mittelwert
 s = SEM n.s. = nicht signifikant (= $p > 0,05$)

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der drei Gruppen ergaben. Dennoch erkennt man einen Trend: die K1-Gruppe zeigte den höchsten Blutverlust, gefolgt von der Fibrinklebergruppe. Die Histoacrylgruppe verlor intraoperativ am wenigsten Blut. Die Ergebnisse decken sich mit denen des Parameters „Blutungszeit“.

3.4. Reseziertes Leberstück

Die Leberteileresektion wurde mittels einer geraden Schere entsprechend der in der Literatur gemachten Angaben durchgeführt (JAKOB et al. 1984; NUR et al. 2005). Da es bei diesem Versuchsplan keine Methode gab, mit der es möglich war, ein standardisiertes, definiert großes Teilstück der Leber zu reseziere, wurde optisch ein möglichst immer gleichgroßes Leberstück entfernt. Durch dieses Prozedere ergibt sich konsequenterweise eine gewisse Streuung der entnommen Probengewichte. Insgesamt wurden dennoch eine geringe Streuung der Gewichte (s. Tab. 6) festgestellt.

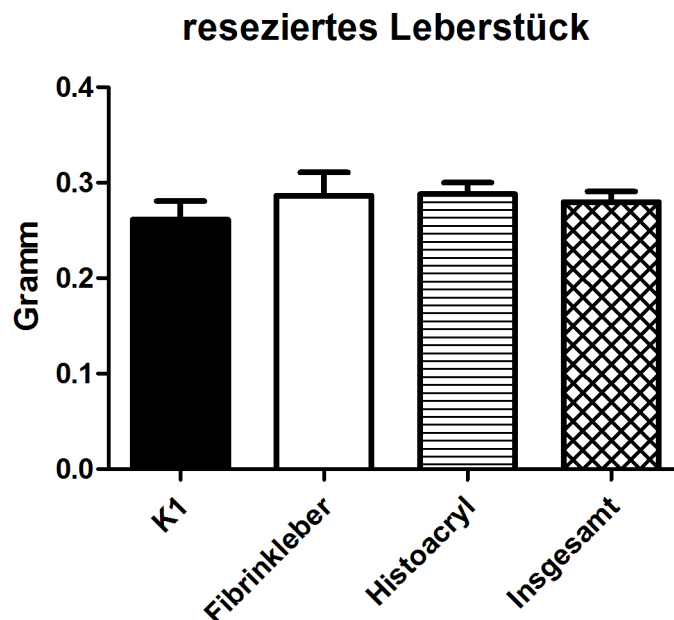


Abb. 12: *Durchschnittlich reseziertes Leberstück der verschiedenen Versuchsgruppen in Gramm (dargestellt als Mittelwert (\bar{x}) mit SEM)*

($p \geq 0,05$ bei K1 vs. Fibrinkleber, K1 vs. Histoacryl und Fibrinkleber vs. Histoacryl)

Die Gewichte der resezierten Leberstücke der drei Gruppen: K1, Fibrinkleber und Histoacryl unterschieden sich nicht signifikant voneinander (s. Abb. 12 und Tab. 6).

	reseziertes Leberstück (in Gramm)						
Gruppe	n	x	s	Median	Min	Max	p-Wert
K1	10	0,261	0,019	0,261	0,155	0,369	n.s.: vs. Fibrinkleber, Histoacryl
Fibrinkleber	12	0,286	0,025	0,281	0,166	0,514	n.s.: vs. K1; Histoacryl
Histoacryl	12	0,288	0,012	0,298	0,218	0,362	n.s.: vs. K1; Fibrinkleber
Insgesamt	34	0,280	0,011	0,278	0,155	0,514	n.d.

Tab. 6: Auswertung des resezierten Leberstückes, eingeteilt in drei Klebergruppen und eine Gesamtübersicht

n = Anzahl der ausgewerteten Tiere

s = SEM

n.d. = nicht definiert

x = Mittelwert

n.s. = nicht signifikant (= $p > 0,05$)

Man kann zusammenfassen, dass die resezierten Leberstücken der verschiedenen Klebergruppen sich nicht signifikant voneinander unterschieden. Die Streuung der Gewichte war trotz des angewendeten Augenmaßes sehr gering.

3.5. Laborparameter

Bei jedem Versuchstier wurden sowohl präoperativ als auch postoperativ am Finaltag (nach 7 bzw. 21 Tagen) verschiedene Blutparameter bestimmt.

Die präoperativen Werte werden im Folgenden als Kontrollwerte angesehen. D.h. es erfolgt hier keine Auswertung in den drei verschiedenen Gruppen. Die vor der Leberresektion gemessenen Werte aller Tiere (unabhängig von den Gruppen) stellen eine eigene präoperative Kontrollgruppe dar. So wurde bei jedem der verschiedenen zu messenden Laborparameter ein eigener Referenzbereich ermittelt, mit dem die Werte nach der OP verglichen werden können, um eine Aussage über die Wirkung und Anwendung des jeweiligen Klebers und den Gesundheitszustand der Versuchstiere treffen zu können.

3.5.1. Erythrozyten

Erythrozyten sind hauptsächlich für den Sauerstofftransport im Blut verantwortlich. Ermöglicht wird dies durch Hämoglobin, an das der Sauerstoff locker gebunden wird (Oxygenierung).

Die Anzahl der Erythrozyten im Blut wurde als Parameter für die Funktion des Klebers gemessen. Sollte der Kleber im Nachhinein seine Wirkung nicht mehr

entfalten, würde es zu chronischen Blutungen kommen. Dies würde sich dann in Form einer regenerativen Anämie bemerkbar machen, so dass folglich ein solcher Blutverlust ein Qualitätskriterium des eingesetzten Klebers ist.

Sowohl nach 7, als auch nach 21 Tagen, zeigten sich weder innerhalb noch zwischen den einzelnen Klebergruppen signifikante Unterschiede (s. Tab. 7).

Alle ermittelten Erythrozytenwerte lagen im Normbereich. Die Ratten zeigten somit keine Anzeichen einer regenerativen Anämie bedingt durch einen erhöhten und nachfolgenden Blutverlust.

Erythrozyten ($\times 10^{12}$ /l)	Referenzwert	K1		Fibrinkleber		Histoacryl		p-Wert
		7 Tage	21 Tage	7 Tage	21 Tage	7 Tage	21 Tage	
n	33	5	4	5	5	5	6	n.s.
x	7,18	7,25	7,49	7,50	7,82	7,65	7,65	
s	0,12	0,23	0,30	0,20	0,41	0,32	0,25	
Median	7,05	7,10	7,44	7,35	8,14	7,44	7,69	
Min	6,06	6,71	6,83	7,11	6,31	6,78	6,93	
Max	8,64	8,02	8,27	7,35	8,52	8,55	8,45	

Tab. 7: Auswertung der Erythrozytenkonzentration, eingeteilt in alle drei Klebergruppen und 2 Überlebenszeitpunkte der Versuchstiere

n = Anzahl der ausgewerteten Tiere
s = SEM

x = Mittelwert
n.s. = nicht signifikant (= $p > 0,05$)

3.5.2. Hämoglobin

Das Hämoglobin ist ein eisenhaltiges Protein und ein Hauptbestandteil der Erythrozyten. Durch den Prozess der Oxygenierung kann Sauerstoff reversibel an dieses Protein angelagert werden. Die Konzentration an Hämoglobin wird zum Nachweis einer möglichen Anämie im Blut bestimmt. Bei einer zu geringen Konzentration spricht man von einer hypochromen Anämie.

Ebenso wie bei dem Parameter Erythrozyten konnten bei den drei Gruppen und den verschiedenen Überlebenszeitpunkten keine Abweichung von den Referenzwerten bestimmt werden, oder ein bedeutender Unterschied zwischen den Gruppen (s. Tab. 8). Somit kann durch die Bestimmung des Hämoglobins im Blut der Tiere

eine Anämie, bedingt durch die Leberresektion und die Klebung der Gewebekleber, ausgeschlossen werden.

Hämoglobin (g/ dl)	Referenzwert	K1		Fibrinkleber		Histoacryl		p-Wert
		7 Tage	21 Tage	7 Tage	21 Tage	7 Tage	21 Tage	
n	33	5	4	5	5	5	6	n.s.
x	14,6	14,4	15,3	14,5	14,8	15,3	14,7	
s	0,2	0,4	0,5	0,3	0,8	0,3	0,2	
Median	14,9	14,00	15,1	14,2	15,2	15,5	14,6	
Min	12,8	13,4	14,3	13,9	11,9	14,3	14	
Max	16,5	15,4	16,8	15,6	16,8	16	15,3	

Tab. 8: *Auswertung der Hämoglobinkonzentration nach 7 bzw. 21 Tage, eingeteilt in K1-, Fibrinkleber- und Histoacrylgruppe, im Vergleich zur Kontrollgruppe (Referenzwert)*

n = Anzahl der ausgewerteten Tiere
s = SEM

x = Mittelwert
n.s. = nicht signifikant (= $p > 0,05$)

3.5.3. Hämatokrit

Der Hämatokrit bezeichnet den relativen Anteil aller zellulären Bestandteile am Gesamtvolumen des Blutes. Dadurch, dass zirka 99% der zellulären Blutbestandteile Erythrozyten sind, ist dieser Wert ebenfalls ein klassischer Parameter zur Bestimmung einer möglichen Anämie. Der Parameter ist dimensionslos.

Auch hier kam es, wie beim Parameter Erythrozyten und Hämoglobin, bei keiner der drei verschiedenen Gruppen und den zwei Überlebenszeitpunkten zu einem signifikanten Unterschied untereinander oder im Bezug auf den Referenzwert (s. Tab. 9).

So lässt sich abschließend mit diesem Messwert eine Anämie ausschließen.

Hämatokrit (%)	Referenzwert	K1		Fibrinkleber		Histoacryl		p-Wert
		7 Tage	21 Tage	7 Tage	21 Tage	7 Tage	21 Tage	
n	33	5	4	5	5	5	6	n.s.
x	36,3	36,1	37,9	35,8	37,0	37,9	36,3	
s	0,4	1,1	1,6	0,8	2,0	0,8	0,8	
Median	36,3	35,40	37,7	35,5	37,7	37,8	36,8	
Min	32,4	33,6	34,4	34,3	29,6	35,9	33,9	
Max	41,4	38,8	42	38,8	41,9	40,1	38,6	

Tab. 9: Auswertung des Hämatokrits nach 7 bzw. 21 Tage, eingeteilt in K1-, Fibrinkleber- und Histoacrylgruppe, im Vergleich zur Kontrollgruppe (Referenzwert)

n = Anzahl der ausgewerteten Tiere
s = SEM

x = Mittelwert
n.s. = nicht signifikant (= $p > 0,05$)

3.5.4. Leukozyten

Ein so genanntes weißes Blutbild, bei dem die Konzentration der weißen Blutkörperchen (Leukozyten) erhoben wird, wird bei einem Entzündungsgeschehen im Organismus angefertigt.

Bei keiner Gruppe konnten signifikant erhöhte oder erniedrigte Leukozytenwerte im Bezug auf den Referenzwert ermittelt werden, somit lässt sich ein Entzündungsgeschehen bei allen Tieren ausschließen (s. Tab. 10).

Leukozyten ($\times 10^9/l$)	Referenzwert	K1		Fibrinkleber		Histoacryl		p-Wert
		7 Tage	21 Tage	7 Tage	21 Tage	7 Tage	21 Tage	
n	33	5	6	5	5	5	6	n.s.
x	6,8	7,5	7,0	5,8	7,0	8,4	8,9	
s	0,3	0,9	1,3	0,7	0,5	0,8	1,3	
Median	6,7	7,8	7,4	5,8	6,9	7,8	9,0	
Min	3,6	4,1	3,9	3,4	6,2	6,5	4,6	
Max	11,7	9,7	9,2	7,7	8,7	10,6	12,5	

Tab. 10: Auswertung der Leukozytenzahl nach 7 bzw. 21 Tage, eingeteilt in K1-, Fibrinkleber- und Histoacrylgruppe, im Vergleich zur Kontrollgruppe (Referenzwert)

n = Anzahl der ausgewerteten Tiere
s = SEM

x = Mittelwert
n.s. = nicht signifikant (= $p > 0,05$)

3.5.5. Thrombozyten

Thrombozyten sind Zellfragmente im Blut und spielen eine wichtige Rolle bei der intrinsischen und extrinsischen Blutgerinnung. Durch die Erhebung der Konzentration dieser Zellbestandteile im Blut kann folglich ein Rückschluss auf eine mögliche Gerinnungsstörung erhalten werden.

Wie auch bei den vorangegangenen Laborparametern zeigte sich hier in keiner Gruppe zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied im Bezug auf die Kontrollgruppe (s. Tab. 11) oder im Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen.

Eine Gerinnungsstörung des intrinsischen Weges kann somit nahezu ausgeschlossen werden.

Thrombozyten (/l)	Referenzwert	K1		Fibrinkleber		Histoacryl		p-Wert
		7 Tage	21 Tage	7 Tage	21 Tage	7 Tage	21 Tage	
n	33	5	4	5	5	5	6	n.s.
x	826	733	830	1031	922	892	1037	
s	37	219	44	37	34	98	67	
Median	904	979,00	863	1053	950	952	1026	
Min	270	145	699	938	823	515	763	
Max	1143	1245	897	1135	990	1081	1232	

Tab. 11: *Auswertung der Thrombozytenanzahl nach 7 bzw. 21 Tage, eingeteilt in K1,- Fibrinkleber- und Histoacrylgruppe, im Vergleich zur Kontrollgruppe (Referenzwert)*

n = Anzahl der ausgewerteten Tiere
s = SEM

x = Mittelwert
n.s. = nicht signifikant (= $p > 0,05$)

3.5.6. Aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT)

Bei der Blutgerinnung kommt es zu einem komplizierten kaskadischen Ablauf von einzelnen Reaktionsschritten, bei denen nicht nur Thrombozyten involviert sind, sondern auch Proteine, die in der Leber gebildet werden. Eines dieser Eiweiße ist Thromboplastin. Die Bestimmung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit dient vorwiegend als Test zur Beurteilung des intrinsischen Gerinnungssystems.

Es konnte festgestellt werden, dass sich die Werte der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit der verschiedenen Gruppen nach 7 bzw. 21 Tagen untereinander

nicht signifikant unterschieden. Allerdings lässt Abb. 13 und Tab. 12 erkennen, dass bei der K1-Gruppe (nach 21 Tagen) signifikant niedrigere Werte gemessen wurden im Vergleich zur Kontrolle.

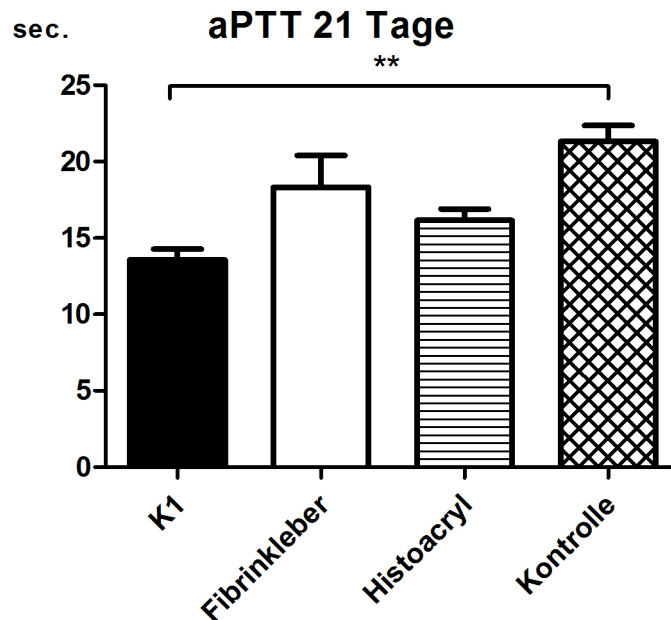


Abb. 13: aPTT 21 Tage nach OP, eingeteilt in K1-, Fibrinkleber- und Histoacrylgruppe, im Vergleich zur Kontrollgruppe (dargestellt als Mittelwert (x) mit SEM)

(** : $p < 0,01$ bei K1 vs. Kontrolle; $p \geq 0,05$ bei Fibrinkleber vs. Kontrolle und Histoacryl vs. Kontrolle)

aPTT (sec.)	Referenzwert	K1		Fibrinkleber		Histoacryl		p-Wert
		7 Tage	21 Tage	7 Tage	21 Tage	7 Tage	21 Tage	
n	26	6	6	4	5	5	5	alles n.s. bis auf K1 vs. Kontrolle 21 Tage: ** $p < 0,01$
x	21,3	20,2	13,4	18,1	20,5	17,1	16,2	
s	1,0	1,0	0,6	2,0	2,7	0,7	0,8	
Median	20,5	21,5	13,1	17,2	19,8	16,2	16,4	
Min	13,8	16,3	12,4	14,6	13,9	16,0	13,4	
Max	32,3	22,2	16,3	23,3	29,1	18,8	18,0	

Tab. 12: Auswertung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit nach 7 bzw. 21 Tage, eingeteilt in K1-, Fibrinkleber- und Histoacrylgruppe, im Vergleich zur Kontrollgruppe (Referenzwert)

n = Anzahl der ausgewerteten Tiere
s = SEM

x = Mittelwert
n.s. = nicht signifikant (= $p > 0,05$)

3.5.7. Aspartat-Aminotransferase (AST)

Die Aspartat-Aminotransferase (AST) ist ein Enzym, das vorwiegend in der Leber und in der Muskulatur, auch Herzmuskulatur, vorkommt. Die Aktivität dieses Enzyms im Blut wurde bestimmt, um Grad und Ausmaß der Leberschädigung nach der Leberteilektomie beurteilen zu können. Durch die Tatsache, dass die Tiere keiner körperlichen Belastungen unterlagen und die Tiere gesund waren, beeinflussen Muskulatur und Herz die Enzymwerte nicht.

In keiner der drei Klebergruppen, weder nach 7 Tagen, noch nach 21 Tagen, konnte im Folgenden ein signifikanter Unterschied im Vergleich zum präoperativ aufgestellten Referenzwert oder im Vergleich zwischen den Gruppen errechnet werden (s. Tab. 13).

AST (U/L)	Referenzwert	K1		Fibrinkleber		Histoacryl		p-Wert
		7 Tage	21 Tage	7 Tage	21 Tage	7 Tage	21 Tage	
n	34	6	6	5	6	6	6	n.s.
x	23,9	22,8	26,0	24,6	23,8	22,7	27,2	
s	0,7	0,7	2,1	2,2	1,8	1,2	1,5	
Median	23,0	22,5	24,5	25,0	22,5	21,5	26,5	
Min	11,0	21,0	20,0	19,0	19,0	20,0	23,0	
Max	40,0	26,0	33,0	32,0	32,0	28,0	34,0	

Tab. 13: Auswertung der AST nach 7 bzw. 21 Tage, eingeteilt in K1,- Fibrinkleber- und Histoacrylgruppe, im Vergleich zur Kontrollgruppe (Referenzwert)

n = Anzahl der ausgewerteten Tiere
s = SEM

x = Mittelwert
n.s. = nicht signifikant (= $p > 0,05$)

3.5.8. Alanin-Aminotransferase (ALT)

Die Alanin-Aminotransferase (ALT) gilt ebenfalls wie die AST als leberspezifisches Enzym und kommt allerdings im Gegensatz zur AST in der Muskulatur nur in geringem Maße vor. ALT wird im Vergleich zu AST mitbestimmt, um den Ursprungsort der Freisetzung – Leber vs. Muskulatur – genauer bestimmen zu können.

Sowohl beim Leberparameter AST, als auch bei der Bestimmung der ALT konnten keine Abweichungen von der Norm oder zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden. Somit kann eine Leberschädigung bedingt durch die verwendeten Kleber vermutlich ausgeschlossen werden (s. Tab. 14).

ALT (U/L)	Referenzwert	K1		Fibrinkleber		Histoacryl		p-Wert
		7 Tage	21 Tage	7 Tage	21 Tage	7 Tage	21 Tage	
n	34	6	6	5	6	6	6	n.s.
x	20,9	17,7	22,8	17,4	19,7	17,7	20,0	
s	0,5	0,8	1,4	0,5	2,4	0,8	0,8	
Median	20,5	17,5	22,0	17,0	18,5	18,0	20,0	
Min	15,0	16,0	19,0	16,0	13,0	15,0	18,0	
Max	29,0	21,0	29,0	19,0	30,0	20,0	23,0	

Tab. 14: *Auswertung der ALT nach 7 bzw. 21 Tage, eingeteilt in K1,- Fibrinkleber- und Histoacrylgruppe, im Vergleich zur Kontrollgruppe (Referenzwert)*

n = Anzahl der ausgewerteten Tiere
s = SEM

x = Mittelwert
n.s. = nicht signifikant (= $p > 0,05$)

3.5.9. De-Ritis-Quotient

Dieser Quotient wurde von de Ritis et al. (1957) eingeführt und bestimmt das Verhältnis zwischen der AST und ALT Konzentration, die im Serum bestimmt wurde: de-Ritis-Quotient = AST/ ALT.

Je kleiner der Quotient ist, desto geringer ist die Leberschädigung einzustufen. Ein großer (>1) Quotient spricht für eine schwere Leberschädigung.

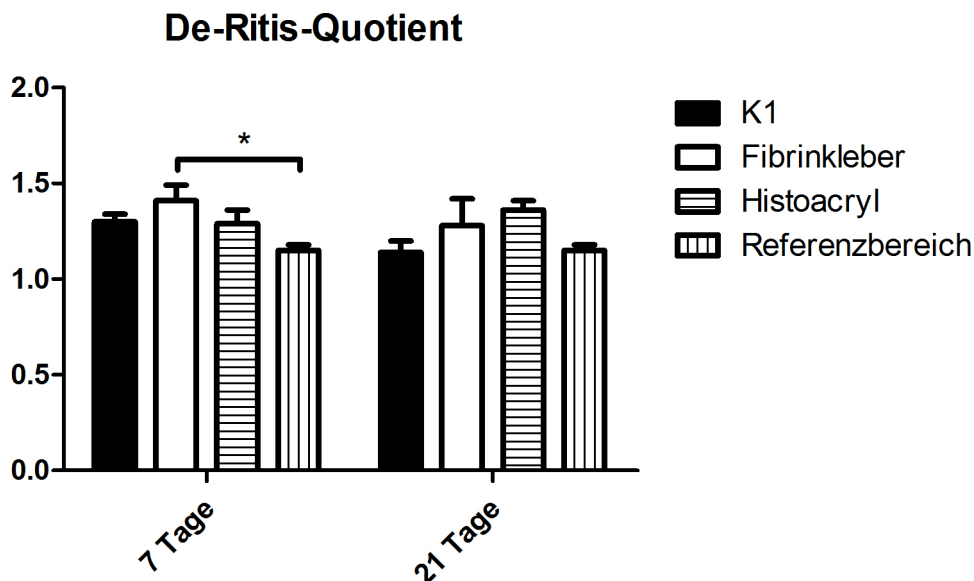


Abb. 14: De-Ritis-Quotient 7 und 21 Tage nach OP, eingeteilt in K1-, Fibrinkleber- und Histoacrylgruppe, im Vergleich zum Referenzbereich (dargestellt als Mittelwert (x) mit SEM) (7 Tage: $p < 0,05$ bei Fibrinkleber vs. Referenzbereich, Rest: n.s.)

Sowohl nach 7 als auch nach 21 Tagen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Klebergruppen. Allerdings unterschied sich die Fibrinklebergruppe nach 7 Tagen signifikant vom Normbereich (s. Abb. 14 und Tab. 15).

De-Ritis-Quotient	Referenzwert	K1		Fibrinkleber		Histoacryl		p-Wert
		7 Tage	21 Tage	7 Tage	21 Tage	7 Tage	21 Tage	
n	34	6	6	5	6	6	6	7 Tage: $p < 0,05$ bei Fibrin vs. Referenzbereich 21 Tage: n.s.
x	1,15	1,30	1,14	1,41	1,28	1,29	1,36	
s	0,03	0,04	0,06	0,08	0,14	0,07	0,05	
Median	1,16	1,30	1,09	1,39	1,20	1,28	1,34	
Min	0,73	1,17	1,05	1,19	0,83	1,10	1,24	
Max	1,74	1,44	1,41	1,68	1,69	1,50	1,50	

Tab. 15: Auswertung des De-Ritis-Quotienten (AST/ ALT) nach 7 bzw. 21 Tage, eingeteilt in K1-, Fibrinkleber- und Histoacrylgruppe, im Vergleich zur Kontrollgruppe (Referenzwert)

(7 Tage: $p < 0,05$ bei Fibrinkleber vs. Referenzwert; Rest n.s.; nach 21 Tagen: n.s.)

n = Anzahl der ausgewerteten Tiere
s = SEM

x = Mittelwert
n.s. = nicht signifikant (= $p > 0,05$)

3.6. Intraabdominelle Adhäsion

Die intraabdominale Adhäsion stellt einen wichtigen Parameter bei der Testung des neuen Klebers dar, da Adhäsionen nach intraabdominellen Eingriffen (Laparotomie, Laparoskopie) häufig auftreten können. Sie können durch verwendete Materialien entstehen und zu einer ernstzunehmenden Komplikation ausarten, die mitunter in einem lebensbedrohlichen Ileus enden kann.

Um sie zu bestimmen, wurden drei Gruppen gebildet:

mild, moderate und severe,

die eine leichte, mittlere oder auch schwerwiegende Adhäsion beschreiben sollten.

Am Finaltag der Versuche (nach 7 oder 21 Tagen) wurde nach Eröffnung der Bauchhöhle zunächst makroskopisch die intraabdominale Adhäsion begutachtet, photographisch festgehalten und anschließend semiquantitativ, nach dem subjektiven Ausmaß der Verwachsungen, Verklebungen und Größe/ Fläche der Adhäsion, in eine der oben genannten Gruppen eingeteilt.

Eine als mild beschriebene Adhäsion wies kaum eine Verwachsung oder Verklebung der Resektionsfläche der Leber oder des evtl. noch vorhandenen Kleber mit der Umgebung auf. Nur locker aufliegendes Netz auf der Kleber-/Leberstelle wurde nicht als Adhäsion bewertet.

War die Kleber-/Leberstelle zusätzlich an einigen kleinen Stellen mit Darm, Magen oder Bauchdecke verbunden, so wurden diese Verwachsung als moderate eingeschätzt.

Schwerwiegende Adhäsionen wiesen komplette Verwachsungen von Darm, Magen, Leberlappen und Netz auf und waren stumpf kaum zu lösen. In diesem Fall konnte die Adhäsion nur in die Gruppe severe eingeteilt werden.

In fast allen Fällen lag das Netz locker und leicht auf der Resektionsfläche auf.

Die folgenden Tabellen beinhalten die Ergebnisse der makroskopischen Beurteilung 7 oder 21 Tage nach OP aufgeteilt in die drei Klebergruppen.

K1-Gruppe, 7 Tage			
Tier	mild	moderate	severe
W1-A-02		X	
W1-A-03	X		
W1-A-16	X		
W1-A-17	X		
W1-A-18		X	
W1-A-37			X

K1-Gruppe, 21 Tage			
Tier	mild	moderate	severe
W1-B-30	X		
W1-B-31	X		
W1-B-32		X	
W1-B-33			X
W1-B-38		X	
W1-B-39		X	

Tab. 16: *Intraabdominale Adhäsion der K1-Gruppe (7, 21 Tage) eingeteilt in mild, moderate und severe*

Fibrinkleber-Gruppe, 7 Tage			
Tier	mild	moderate	severe
W3-A-06	X		
W3-A-07	X		
W3-A-19			X
W3-A-20	X		
W3-A-21	X		
W3-A-22	X		

Fibrinkleber-Gruppe, 21 Tage			
Tier	mild	moderate	severe
W3-B-08	X		
W3-B-09	X		
W3-B-10			X
W3-B-34	X		
W3-B-35	X		
W3-B-36	X		

Tab. 17: *Intraabdominale Adhäsion der Fibrinkleber-Gruppe (7, 21 Tage) eingeteilt in mild, moderate und severe*

Histoacryl-Gruppe, 7 Tage			
Tier	mild	moderate	severe
W4-A-11			X
W4-A-12			X
W4-A-23		X	
W4-A-24		X	
W4-A-25		X	
W4-A-26			X

Histoacryl-Gruppe, 21 Tage			
Tier	mild	moderate	severe
W4-B-13			X
W4-B-14			X
W4-B-15			X
W4-B-27		X	
W4-B-28			X
W4-B-29			X

Tab. 18: *Intraabdominale Adhäsion der Histoacryl-Gruppe (7, 21 Tage) eingeteilt in mild, moderate und severe*

Um Aussagen über die Häufigkeit und das durchschnittliche Vorkommen von verschiedenen Adhäsionen in den verschiedenen Klebergruppen und natürlich um Aussagen über eventuelle signifikante Unterschiede machen zu können, wurde die Einteilung in ein Punktesystem umgewandelt.

Ein Punkt wurde bei einer Einordnung in „mild“ vergeben; zwei Punkte bei einer mittleren Adhäsion und drei Punkte pro schwerwiegender Verwachsung.

Mithilfe dieser Auswertung konnte Abb. 15 und 16 erstellt werden.

Wie man aus Tabelle 16 und ebenso den Abb. 15 und 16 entnehmen kann, konnte die Adhäsion bei der K1-Gruppe überwiegend als gut („mild“ – „moderate“) beurteilt werden. Sowohl die 7-Tage-Tiere als auch die 3-Wochen-Tiere zeigten keine bis nur geringe Verwachsungen der Schnittfläche mit herumliegenden Fettgewebe, Netz, Darm oder Magen.

Im Vergleich hierzu zeigt sich ein etwas anderes Ergebnis beim Fibrinkleber:

knapp 85% der Tiere zeigten keine bis geringste Verwachsungen mit dem übrigen Gewebe und konnten somit als „mild“ beurteilt werden, und nur ein Tier aus beiden Überlebenszeitpunkten fielen in die Kategorie severe.

Die Gruppe der mit Histoacryl behandelten Tiere zeigte im Vergleich zu K1 und Fibrinkleber eine andere Einteilung: keine der Adhäsionen konnten als „mild“ beurteilt werden, so dass vor allem eine Einteilung in „moderate“ oder „severe“ stattfand (s. Tab. 18). Alle anderen Tiere, die mit Histoacryl nach der Resektion behandelt wurden, zeigten schwerste Adhäsionen.

Abbildung 15 und 16 veranschaulichen dies zusätzlich. Die Adhäsionen von der Fibrinkleber- und Histoacrylgruppe unterschieden sich in den 7 Tages-Gruppen signifikant ($p < 0,5$) voneinander. Obwohl sowohl in Abb. 15 als auch in Abb. 16 ein Unterschied zwischen K1 und Histoacryl zu erkennen ist, ließ sich aufgrund der hohen Varianz der Ergebnisse keine Signifikanz ermitteln.

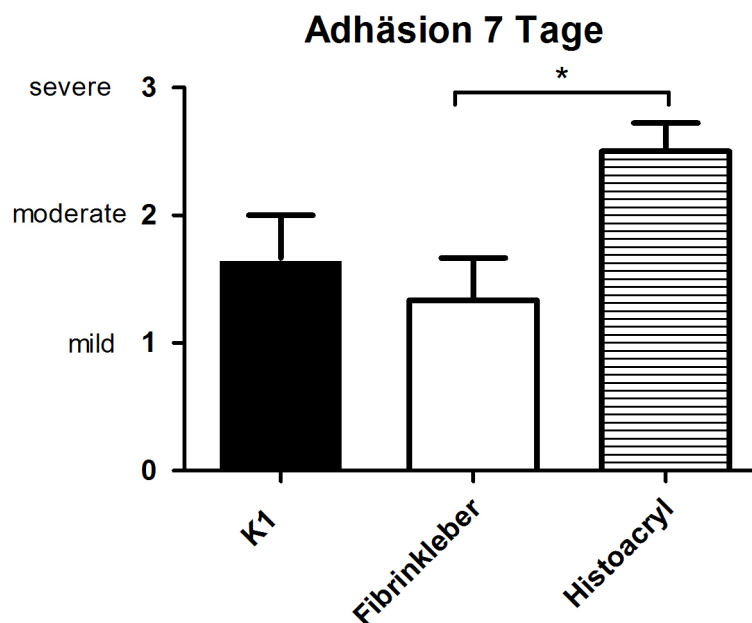


Abb. 15: Adhäsion der 7-Tage-Gruppe von K1 im Vergleich zu Fibrinkleber und Histoacryl (dargestellt als Mittelwert (\bar{x}) mit SEM)

(*: $p < 0,05$ bei Fibrinkleber vs. Histoacryl; $p \geq 0,05$ bei K1 vs. Fibrinkleber und K1 vs. Histoacryl)

Nach 21 Tagen ist zwischen Fibrinkleber und Histoacryl ein deutlicherer Unterschied zu erkennen: hier ließ sich ein hoch signifikanter ($p < 0,01$) Unterschied berechnen. K1 verhält sich nicht signifikant unterschiedlich zu den anderen beiden Gruppen und bestätigt somit die Ergebnisse aus der 7-Tage Gruppe.

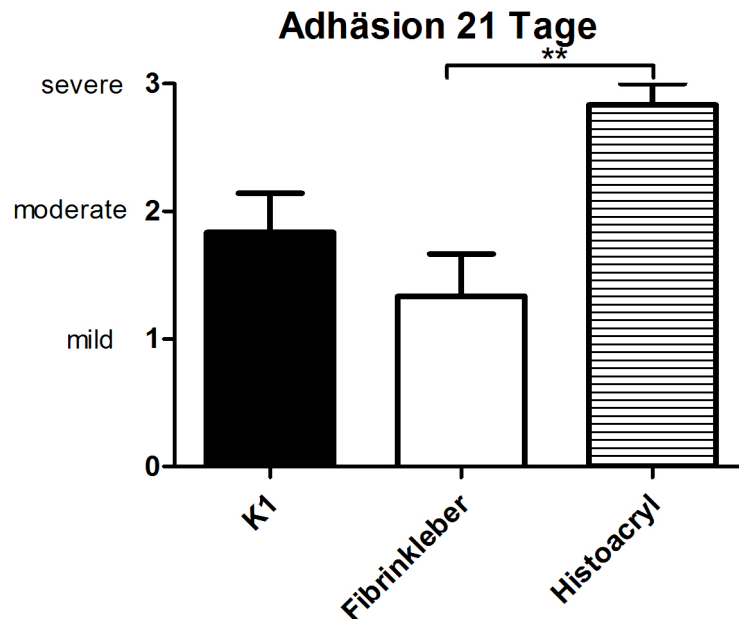


Abb. 16: Adhäsion der 21-Tage-Gruppe von K1 im Vergleich zu Fibrinkleber und Histoacryl (dargestellt als Mittelwert (x) mit SEM)

(** : $p < 0,01$ bei Fibrinkleber vs. Histoacryl und $p < 0,05$ bei K1 vs. Fibrinkleber und K1 vs. Histoacryl)

Repräsentative makroskopische Befunde der Adhäsionen und die subjektive Einteilung in die drei Kategorien mild, moderate und severe sind in Abbildung 17-19 dargestellt.

In Abb. 17 A (W1-A-16) erkennt man, dass die Resektionsfläche nur leicht mit Netz (N) überzogen ist, unter dem der Kleber liegt. Die Adhäsionsfläche ist genauso lang wie die Schnittfläche (S) (dies ist nicht automatisch und überall der Fall). K1 ist auch nach 7 Tagen noch auf der Resektionsfläche vorhanden und lässt sich auf der gesamten Länge der Schnittfläche erkennen. Hier wurde die intraabdominale Adhäsion als mild bewertet, da sich das Netz nur locker über den Kleber und die Resektionsstelle gelegt hatte.

Abbildung B (W1-A-18) veranschaulicht eine mittelschwere Adhäsion. Die Resektionsfläche wurde nicht nur von Netz überzogen, sondern es wurde auch Darm (D) in das Adhäsionsgeschehen mit einbezogen.

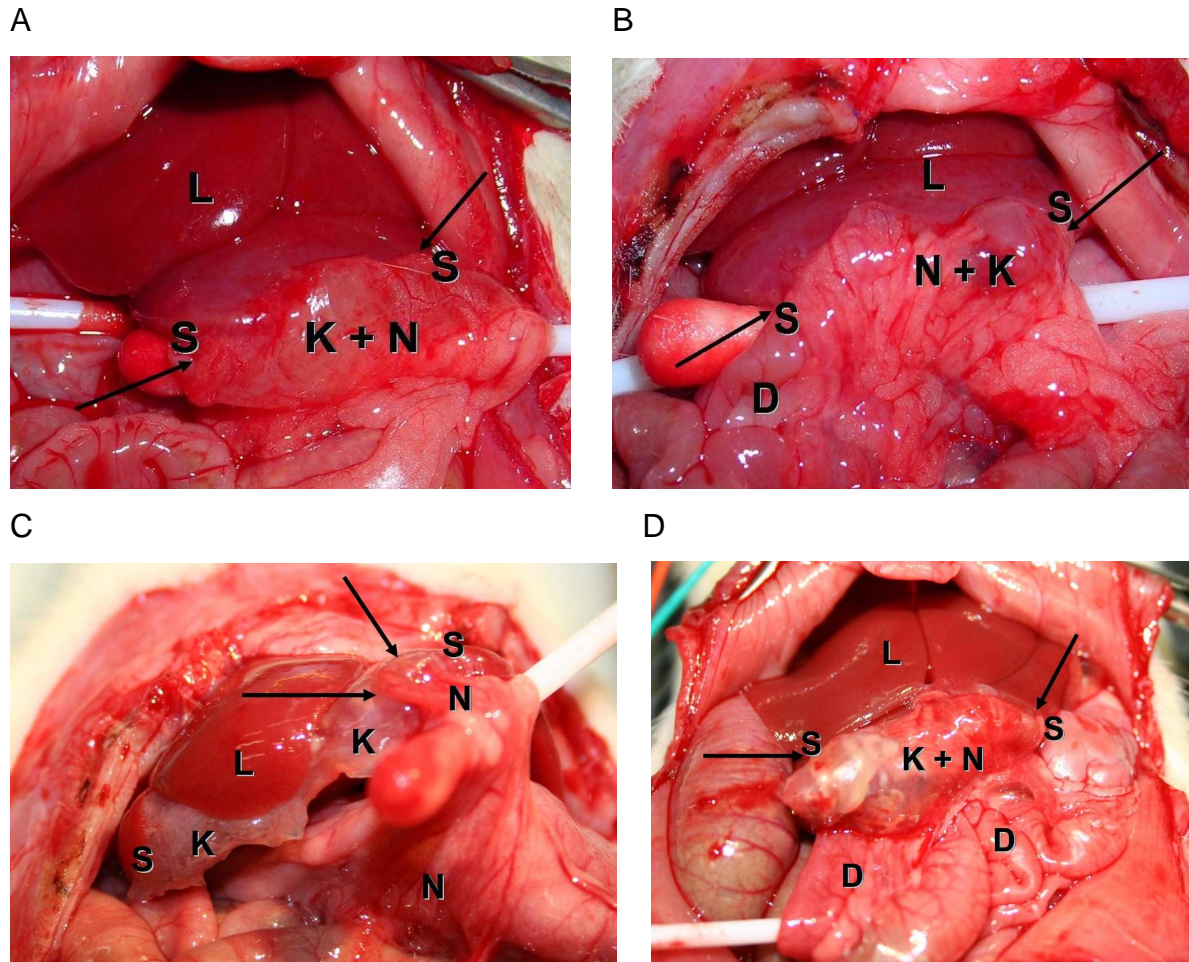


Abb. 17: Repräsentativer makroskopischer Befund von K1 nach 7 Tagen (A und B) und nach 21 Tagen (C und D). Die Pfeile zeigen auf den Anfang und das Ende der Adhäsionsfläche, die nicht immer gleich der Resektionsfläche (S) ist (s. C).

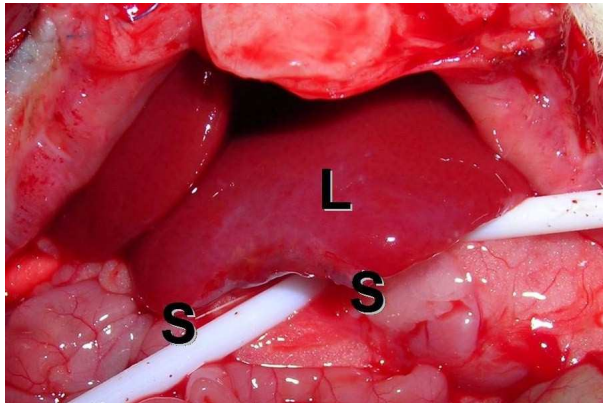
K = Kleber L = Leber N = Netz

D = Darm S = Resektionsfläche (Schnittfläche), Anfang und Ende wird markiert, falls möglich

Abbildung C und D zeigen den Zustand der Leberteilsektion nach erfolgreicher Klebung von K1 nach 21 Tagen. C (W1-B-30) wurde in die Kategorie „mild“ eingeteilt. Eine Adhäsion konnte nur an einer Ecke an der rechten Seite (s. Pfeile) festgestellt werden. Mit K gekennzeichnet erkennt man hier sehr deutlich den transparenten Kleber, der bei diesem Tier, bis auf die rechte Seite, nicht mit Netz überzogen oder mit der Umgebung verbunden war.

Abbildung D (W1-B-33) stellt eine schwerere Verwachsung dar: Der Kleber K1 war am Finaltag nicht nur mit Netz überzogen, sondern war auch mit Darm und auf der rechten Seite mit Teilen des Magens verklebt.

A



B

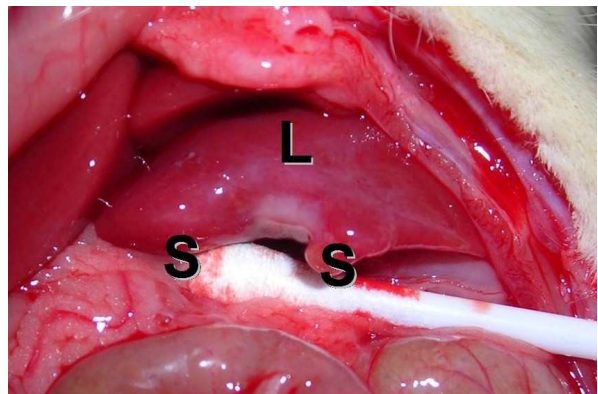
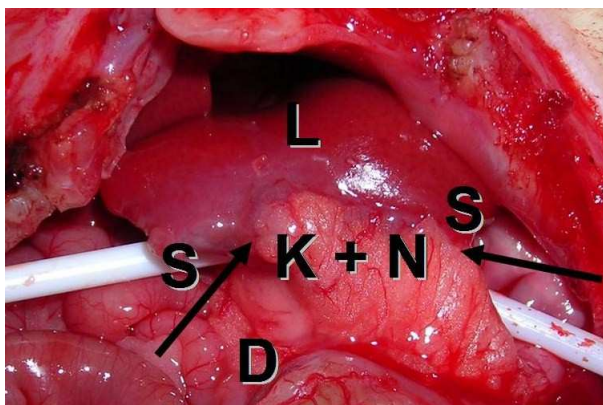


Abb. 18: Repräsentativer makroskopischer Befund der Fibrinklebergergruppe nach (A) 7 Tagen und nach (B) 21 Tagen. Fibrinkleberreste sind nicht zu sehen, ebenso keine Adhäsionen
L = Leber S = Resektionsfläche (Schnittfläche)

Wie bereits oben erwähnt (s. Tab. 17 und Abb. 15 und 16) konnten die Adhäsionen der Gruppe, in der Fibrinkleber zur Blutstillung verwendet wurde, überwiegend als gut („mild“) beurteilt werden. Dieser Beurteilung verleihen die Bilder A (W3-A-21) und B (W3-B-09) der Abb. 18 Ausdruck. Sowohl nach 7 als auch nach 21 Tagen konnten kaum Adhäsionen beobachtet werden.

A



B

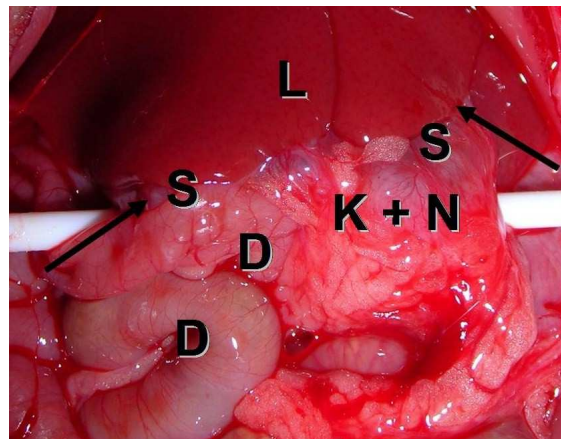


Abb. 19: Repräsentativer makroskopischer Befund der Histoacrylgruppe nach (A) 7 Tagen und nach (B) 21 Tagen. Die Pfeile zeigen die Breite der Adhäsionsfläche an.

L = Leber K+N = Kleber + Netz
D = Darm S = Resektionsfläche (Schnittfläche)

Anders sieht es in den Histoacrylgruppen aus. Bei keinem Tier konnte eine Adhäsion in „mild“ eingeteilt werden. So kann man dem Bild A (W4-A-23) der Abb. 19 entnehmen, dass sowohl Netz als auch Darm beteiligt waren und die Adhäsion daher

nur als „moderate“ beurteilt werden konnte. Verhältnismäßig schlimm sah es 21 Tage post OP aus: über 80 % der operierten Tiere konnten nur die Kategorie „severe“ eingeteilt werden.

In Abb. 19 Bild B (W4-B-15) war die komplette Resektionsfläche mit Netz, Darm und Teilen des Magens verklebt und kaum zu überblicken. Zusätzlich kam es auch zu Verwachsungen zwischen den einzelnen Leberlappen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass bei der Anwendung von Fibrinkleber die wenigsten Adhäsionen entstanden sind, und sich die Ergebnisse des K1-Klebers nicht von denen des Fibrinklebers signifikant unterscheiden. Durch die Verwendung von Histoacryl entstanden vorwiegend stärkere Verklebungen mit der Resektionsfläche und dem umliegenden Gewebe und daher schnitt diese Gruppe im Vergleich am schlechtesten ab.

3.7. Histologie

Um die makroskopisch erhaltenen Daten auf zellulärer Ebene zu evaluieren, wurden verschiedene Techniken der Histologie angewandt.

3.7.1. H.E.-Färbung

Mit Hilfe der H.E.-Färbung wurde die hepatozelluläre Schädigung quantifiziert, die bedingt durch die drei verwendeten Gewebekleber innerhalb von 7 bzw. 21 Tagen entstanden sein kann. Außerdem wurde das Ausmaß des inflammatorischen Infiltrates bestimmt.

Zur Auswertung wurde histomorphologisch eine bestimmte Zone in den Präparaten beurteilt: die Reaktionszone (eine entstehende Zone zwischen dem aufgetragenen Kleber und der Leber, vgl. Kapitel 2.5.1.).

3.7.1.1. Bestimmung der Reaktionszone in μm

Die Breite der Reaktionszone wurde ermittelt, um das Ausmaß der Reaktion der Leber auf den verwendeten Gewebekleber zu bestimmen.

Dazu wurde die Breite der reaktiven Zone ab dem Leberrand pro Präparat in mindestens 10 Gesichtsfeldern bei 400facher Vergrößerung gemessen und für jede Probe der Mittelwert der 10 Messungen bestimmt.

Zum Zeitpunkt 7 Tage konnte kein signifikanter Unterschied der Reaktionszonen zwischen den einzelnen Kleber-Gruppen ermittelt werden. Dies galt auch für den Zeitpunkt 21 Tage (s. Abb. 20 und 21, Tab. 19).

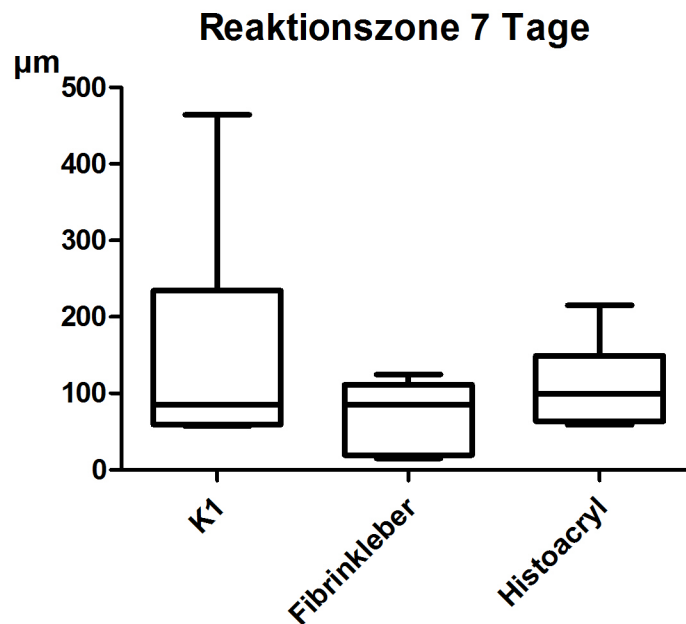


Abb. 20: Darstellung der Reaktionszonenbreite in μm 7 Tage post OP als Boxplot, eingeteilt in die drei Klebergruppen

(n.s.: $p > 0,05$ bei K1 vs. Fibrinkleber; K1 vs. Histoacryl und Fibrinkleber vs. Histoacryl)

Obwohl sich nach 7 Tagen keine signifikanten Unterschiede errechnen ließen, lässt sich in Abb. 20 erkennen, dass die Reaktionszone bei der K1-Gruppe tendenziell größer ausfiel als beim Fibrinkleber oder bei der Gruppe, bei der mit Histoacryl gearbeitet wurde. Allerdings erreichten diese Tendenzen aufgrund der hohen Varianz der Ergebnisse keine statistische Signifikanz (s. Abb. 20 und Tab. 19).

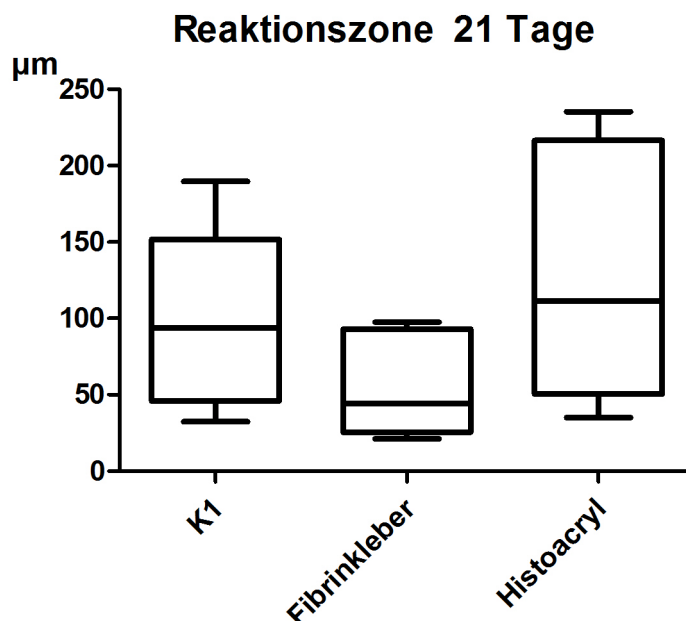


Abb. 21: Darstellung der Reaktionszonenbreite in μm 21 Tage post OP als Boxplot, eingeteilt in die drei Klebergruppen (n.s.: $p > 0,05$ bei K1 vs. Fibrinkleber; K1 vs. Histoacryl und Fibrinkleber vs. Histoacryl)

Zum Zeitpunkt 21 Tage zeigte sich ein anderes Bild als zum Zeitpunkt 7 Tage. Tendenziell ist das Ausmaß der Reaktionszone der K1-Gruppe zwar auch hier größer als bei der Fibrinklebergruppe einzuordnen, allerdings zeigten sich in der Histoacrylgruppe die höchsten Werte (s. Abb. 21 und Tab. 19).

Gruppe		n	$\bar{x} \pm s$	Max	p-Wert
K1	7 Tage	6	152 ± 64	520	n.s.
	21 Tage	6	100 ± 24	414	
Fibrinkleber	7 Tage	5	69 ± 21	342	
	21 Tage	6	54 ± 13	230	
Histoacryl	7 Tage	6	111 ± 24	335	
	21 Tage	6	126 ± 34	505	

Tab. 19: Auswertung der Reaktionszone in μm am 7. bzw. 21. postoperativen Tag, eingeteilt in die drei Klebergruppen

n = Anzahl der ausgewerteten Präparate
s = SEM

\bar{x} = Mittelwert
n.s. = nicht signifikant

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich die drei Klebergruppen bei beiden Überlebenszeitpunkten hinsichtlich der Reaktionszonenbreite nicht signifikant

unterschieden. K1 hinterlässt nach 7 Tagen tendenziell jedoch eine größere Reaktion, nach 21 Tagen reagiert das Gewebe am meisten bei der Anwendung mit Histoacryl.

3.7.1.2. Bestimmung verschiedener Parameter in der Reaktionszone

Zusätzlich zur Ausdehnung der Reaktionszone (s. 3.1.7.1.) wurde das inflammatorische Infiltrat und das Ausmaß der Reaktion dieser Zone bestimmt. Dazu wurden verschiedene Parameter festgelegt (s. Tab. 20 und 21), die bei einer 400fachen Vergrößerung der H.E.-Schnitte in mindestens 5 Gesichtsfeldern mittels eines Scoresystems pro Präparat (s. Material und Methodenteil, S. 45) bewertet und ausgewertet wurden.

Eine vereinfachte Übersicht der Ergebnisse zeigt Tab. 20 und 21. Genauere Informationen enthalten die Tabellen 22-29 und die Abbildungen 22-30.

7-Tage-Gruppen	Zellzahl allgemein	Binde- gewebe	Blut- gefäße	Mononukleäre Zellen	Granulozyten	Fremdkörper- riesenzellen	Nekrosen	Granulome
K1	2,42 ± 0,16	2,22 ± 0,16	1,03 ± 0,03	2,33 ± 0,22	0,75 ± 0,14	n.v.	0,31 ± 0,10	1,69 ± 0,15
Fibrinkleber	2,53 ± 0,21	2,20 ± 0,29	1,57 ± 0,15	2,27 ± 0,19	0,80 ± 0,12	0,10 ± 0,10	0,30 ± 0,10	1,03 ± 0,36
Histoacryl	2,45 ± 0,14	2,33 ± 0,24	1,38 ± 0,13	1,94 ± 0,17	0,55 ± 0,12	0,07 ± 0,07	0,17 ± 0,07	0,80 ± 0,18
p-Wert	n.s.	n.s.	* p ≤ 0,05: K1 vs Fibrin.; n.s. p > 0,05: K1 vs Histo. und Fibrin. vs. Histoacryl	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	* p ≤ 0,05: K1 vs Histo.; n.s. p > 0,05: K1 vs Fibrin. und Fibrin vs Histo

Tab. 20: Vereinfachte Übersicht der Auswertung der verschiedenen Parameter in der H.E.-Färbung am 7. postoperativen Tag, eingeteilt in die drei Klebgruppen, Erklärungen zur Datenerhebung sind in den nachfolgenden Tabellen aufgeführt

n.v. = nicht vorhanden n.s. = nicht signifikant

21-Tage-Gruppen	Zellzahl allgemein	Binde- gewebe	Blut- gefäße	Mononukleäre Zellen	Granulozyten	Fremdkörper- riesenzellen	Nekrosen	Granulome
K1	1,96 ± 0,08	2,08 ± 0,08	1,11 ± 0,12	1,22 ± 0,26	0,22 ± 0,12	1,38 ± 0,23	0,03 ± 0,03	1,23 ± 0,28
Fibrinkleber	1,52 ± 0,23	1,71 ± 0,13	1,10 ± 0,16	1,28 ± 0,30	0,51 ± 0,23	0,13 ± 0,09	0,10 ± 0,10	0,15 ± 0,08
Histoacryl	2,09 ± 0,13	2,08 ± 0,11	1,44 ± 0,17	1,68 ± 0,28	0,18 ± 0,09	0,96 ± 0,23	n.v.	0,74 ± 0,20
p-Wert	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	** p ≤ 0,01: K1 vs Fibrinkleber; * p ≤ 0,05: Fibrin- kleber vs Histoacryl; n.s. p > 0,05: K1 vs Histoacryl	n.s.	** p ≤ 0,01: K1 vs Fibrin; n.s. p > 0,05: K1 vs Histo. und Fibrin. vs Histoacryl

Tab. 21: Vereinfachte Übersicht der Auswertung der verschiedenen Parameter in der H.E.-Färbung am 21. postoperativen Tag, eingeteilt in die drei Klebgruppen, Erklärungen zur Datenerhebung sind in den nachfolgenden Tabellen aufgeführt

n.v. = nicht vorhanden n.s. = nicht signifikant

Zellzahl, allgemein

Der Parameter wurde bestimmt, um bewerten zu können, ob eine eher diskrete oder deutliche Reaktion vorhanden war.

Sowohl nach 7 als auch nach 21 Tagen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen oder innerhalb der Klebergruppen bestimmt werden (s. Tab. 22).

Zellzahl allgemein	K1		Fibrinkleber		Histoacryl		p-Wert
	7 Tage	21 Tage	7 Tage	21 Tage	7 Tage	21 Tage	
n	6	6	5	6	6	6	n.s.
x	2,42	1,96	2,53	1,52	2,45	2,09	
s	0,16	0,08	0,21	0,23	0,14	0,13	
Median	2,25	2,00	2,67	1,29	2,35	2,00	
Min	2,00	1,60	1,83	1,17	2,17	1,67	
Max	3,00	2,00	3,00	2,60	3,00	2,67	

Tab. 22: Auswertung des Parameters „Zellzahl, allgemein“ am 7. bzw. 21. Tag post OP, eingeteilt in K1-, Fibrinkleber- und Histoacrylgruppe (Histologie Scoresystem vgl. Material- & Methodenteil)

n = Anzahl der ausgewerteten Präparate
s = SEM

x = Mittelwert
n.s. = nicht signifikant

Bindegewebe

Unter Bindegewebe versteht man verschiedene Zelltypen (wie z.B. Fibroblasten und Fibrozyten) sowie Interzellulärsubstanzen (z.B. extrazelluläre Matrix mit kollagenen Fasern). Das Auftreten von bindegewebigen Strukturen lässt auf die Festigkeit und die Ausprägung des neu entstandenen Gewebes der Reaktionszone schließen.

Die Ergebnisse vom Parameter „Bindegewebe“ ähneln den Ergebnissen der „Zellzahl“. Auch hier konnte nach 7 und 21 Tagen kein signifikanter Unterschied zwischen oder innerhalb der drei Klebergruppen ermittelt werden (s. Tab. 23).

Binde- gewebe	K1		Fibrinkleber		Histoacryl		p-Wert
	7 Tage	21 Tage	7 Tage	21 Tage	7 Tage	21 Tage	
n	6	6	5	6	6	6	n.s.
x	2,22	2,08	2,20	1,71	2,33	2,08	
s	0,16	0,08	0,29	0,13	0,24	0,11	
Median	2,17	2,09	2,17	1,75	2,00	2,09	
Min	1,83	1,80	1,33	1,33	1,50	1,80	
Max	3,00	2,33	2,83	2,00	3,00	2,67	

Tab. 23: Auswertung des Parameters „Bindegewebe“ am 7. bzw. 21. Tag post OP, eingeteilt in K1-, Fibrinkleber- und Histoacrylgruppe (Histologie Scoresystem vgl. Material- & Methodenteil)

n = Anzahl der ausgewerteten Präparate x = Mittelwert
s = SEM n.s. = nicht signifikant

Blutgefäße (incl. Kapillaren)

Die Bildung von Kapillaren verrät inwiefern das verwendete Material die Entstehung von neuen Blutgefäßen nach 7 bzw. 21 Tagen begünstigt oder verhindert.

Blut- gefäße	K1		Fibrinkleber		Histoacryl		p-Wert
	7 Tage	21 Tage	7 Tage	21 Tage	7 Tage	21 Tage	
n	6	6	5	6	6	6	<u>7 Tage:</u> * $p \leq 0,05$: K1 vs Fibrin; n.s. $p > 0,05$: K1 vs Histoacryl, Fibrin vs Histo. und <u>21 Tage:</u> <u>K1 7vs21Tage:</u> ** $p \leq 0,05$
x	1,03	1,11	1,57	1,10	1,38	1,44	
s	0,03	0,12	0,15	0,16	0,13	0,17	
Median	1,00	1,09	1,67	1,00	1,50	1,42	
Min	1,00	0,67	1,17	0,50	0,83	1,00	
Max	1,17	1,50	2,00	1,67	1,67	2,00	

Tab. 24: Auswertung des Parameters „Blutgefäße“ am 7. bzw. 21. Tag post OP, eingeteilt in K1-, Fibrinkleber- und Histoacrylgruppe (Histologie Scoresystem vgl. Material- & Methodenteil)

n = Anzahl der ausgewerteten Präparate x = Mittelwert
s = SEM n.s. = nicht signifikant

Nach 7 Tagen zeigte sich ein geringgradig signifikanter Unterschied zwischen der K1- und der Fibrinklebergergruppe ($p \leq 0,05$ bei K1 vs. Fibrinkleber) (s. Tab. 24 und Abb. 22). Nach 21 Tagen ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen erkennen.

In der K1-Gruppe konnte ein signifikanter Anstieg der Anzahl an Blutgefäßen (s. Tab. 24 und Abb. 22) nachgewiesen werden. Die anderen beiden Gruppen unterschieden sich nach 21 Tagen nicht signifikant von den Werten nach 7 Tagen.

Abb. 23 und 24 stellen repräsentative mikroskopische Bilder der Gruppe K1 und Fibrinkleber nach 7 Tagen dar. Deutlich sind neu gebildete Kapillaren (Endothelzell- und Basalzellschicht) zu erkennen.

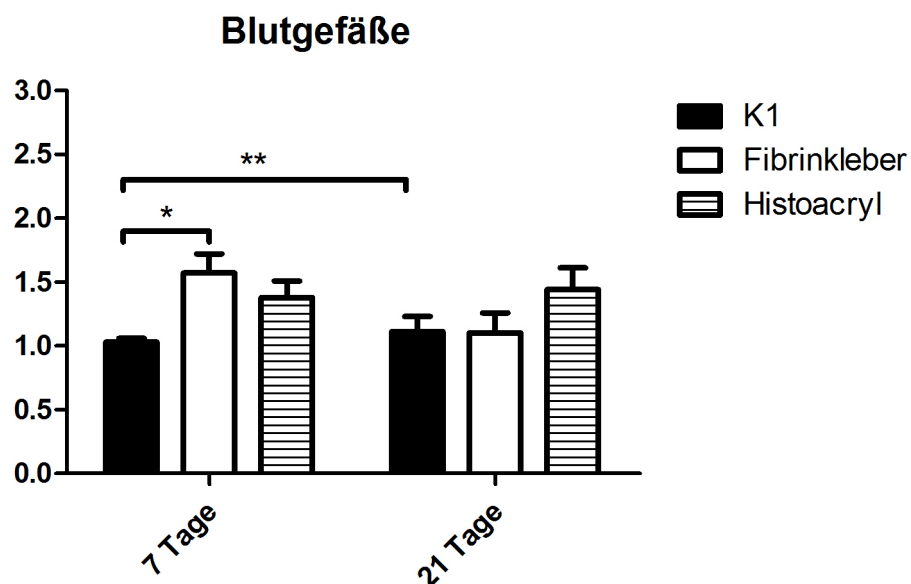


Abb. 22: Graphische Darstellung des Parameters „Blutgefäße/Kapillaren“ in der H.E. - Färbung am 7. und 21. postoperativen Tag, eingeteilt in die drei Klebergeruppen (dargestellt als Mittelwert (\bar{x}) mit SEM)

(7 Tage: * : $p \leq 0,05$ bei K1 vs. Fibrinkleber; $p > 0,05$ bei K1 vs. Histoacryl und Fibrinkleber vs. Histoacryl)

21 Tage: n.s.

7 Tage vs. 21 Tage: **: $p \leq 0,01$ bei K1 7Tage vs. 21 Tage; Rest: n.s.)

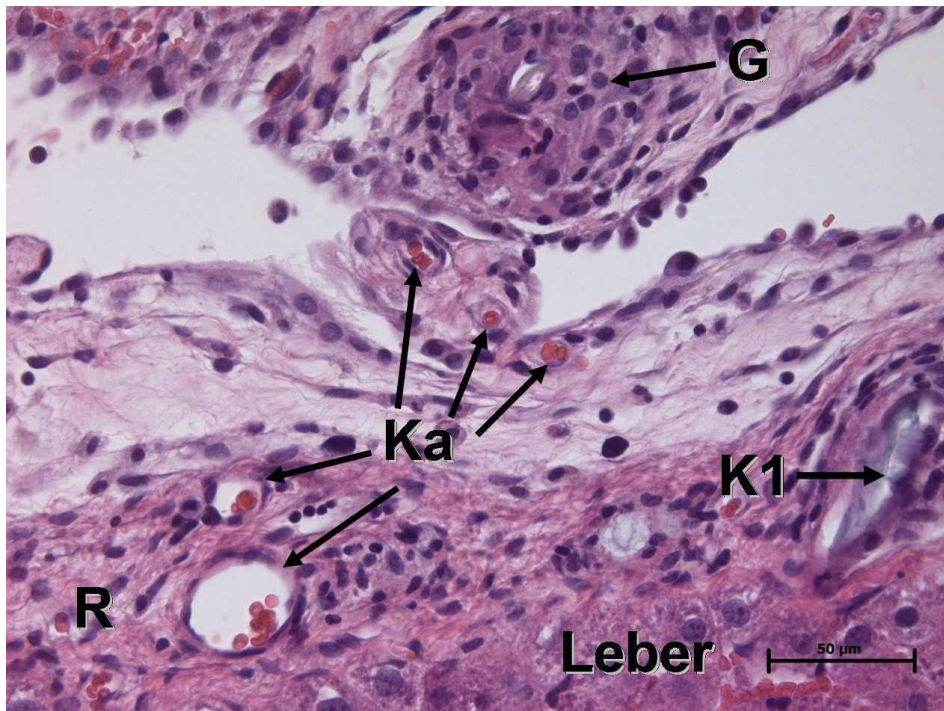


Abb. 23: Repräsentativer mikroskopischer Befund der K1-Gruppe (W1-A-38) nach 7 Tagen, H.E.-Färbung, 400er Vergrößerung

R	= Reaktionszone	Ka	= Kapillare
G	= Granulom	K1	= Kleber K1

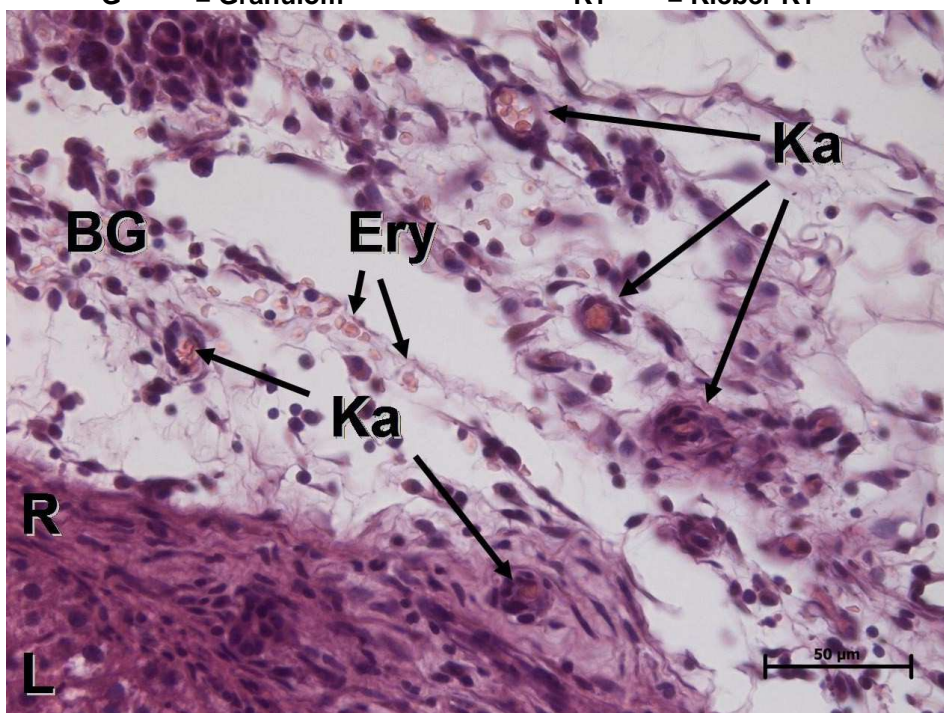


Abb. 24: Repräsentativer mikroskopischer Befund der Fibrinklebergergruppe (W3-A-06) nach 7 Tagen, H.E.-Färbung, 400er Vergrößerung

L	= Leber	R	= Reaktionszone
Ka	= Kapillare	Ery	= Erythrozyten
BG	= Bindegewebe (Fibrozyt)		

Mononukleäre Zellen (Makrophagen, Lymphozyten, Plasmazellen)

Mononukleäre Zellen (MNZ) zählen zu den Entzündungszellen und können auf eine Entzündung hindeuten. Sie besitzen gewisse Eigenschaften, wie z.B. die Aufnahme und Zerstörung von fremdem Material, und somit wichtige Aufgaben bei der Immunabwehr.

Beim Parameter „Mononukleäre Zellen“ konnte weder nach 7 noch nach 21 Tagen ein signifikanter Unterschied zwischen oder innerhalb den unterschiedlichen Gruppen beobachtet werden (s. Tab. 25).

MNZ	K1		Fibrinkleber		Histoacryl		p-Wert
	7 Tage	21 Tage	7 Tage	21 Tage	7 Tage	21 Tage	
n	6	6	5	6	6	6	n.s.
x	2,33	1,22	2,27	1,28	1,94	1,68	
s	0,22	0,26	0,19	0,30	0,17	0,28	
Median	2,42	1,00	2,33	1,25	1,90	1,54	
Min	1,50	0,50	1,67	0,50	1,50	1,00	
Max	3,00	2,17	2,83	2,60	2,67	2,83	

Tab. 25: Auswertung des Parameters „Mononukleäre Zellen“ am 7. bzw. 21. Tag post OP, eingeteilt in K1-, Fibrinkleber- und Histoacrylgruppe (Histologie Scoresystem vgl. Material- & Methodenteil)

n = Anzahl der ausgewerteten Präparate **x** = Mittelwert
s = SEM **n.s.** = nicht signifikant (= $p > 0,05$)
MNZ = Mononukleäre Zellen

Granulozyten

Der Parameter Granulozyten sollte Aufschluss über die Ausdehnung einer möglichen Entzündung in der frühen Phase in der Reaktionszone geben, da neutrophile Granulozyten als so genannten Mikrophagen eine wichtige Funktion in der zellulären Abwehrreaktion spielen und durch chemotaktische Faktoren vermehrt bei entzündlichen Prozessen vorkommen.

Beim Parameter „Granulozyten“ ergab sich nach 7 und nach 21 Tagen und beim Vergleich der 7 und 21 Tage-Werte kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Klebergruppen (s. Tab. 26).

Granulo- zyten	K1		Fibrinkleber		Histoacryl		p-Wert
	7 Tage	21 Tage	7 Tage	21 Tage	7 Tage	21 Tage	
n	6	6	5	6	6	6	n.s.
x	0,75	0,22	0,80	0,51	0,55	0,18	
s	0,14	0,12	0,12	0,23	0,12	0,09	
Median	0,75	0,09	0,83	0,42	0,64	0,09	
Min	0,33	0,00	0,33	0,00	0,00	0,00	
Max	1,33	0,67	1,00	1,20	0,83	0,50	

Tab. 26: Auswertung des Parameters „Granulozyten“ am 7. bzw. 21. Tag post OP, eingeteilt in K1-, Fibrinkleber- und Histoacrylgruppe (Histologie Scoresystem vgl. Material- & Methodenteil)

n = Anzahl der ausgewerteten Präparate
s = SEM

x = Mittelwert
n.s. = nicht signifikant (= $p > 0,05$)

Fremdkörperriesenzellen

Fremdkörperriesenzellen (FKRZ) entstehen durch den Zusammenschluss mehrerer Gewebsmakrophagen und sind häufig Bestandteil von Granulomen. Makrophagen übernehmen verschieden Funktionen im Organismus, u.a. eine phagozytotische Funktion. So kann das Vorhandensein von Makrophagen, und im Speziellen von FKRZ, ein Zeichen dafür sein, dass es zur Mobilisierung von Fremdmaterial kommt, das zuvor z.B. in Form von Kleberresten aufgetreten ist.

Zum Zeitpunkt 7 Tage ließen sich keine signifikanten Unterschiede bestimmen (s. Tab. 27). In der K1-Gruppe wurden keine FKRZ gefunden, so dass sich in Tabelle 27 nur 0-Werte (= nicht vorhanden) finden lassen. Auch in den anderen beiden Klebergruppen konnten nur sehr wenige FKRZ entdeckt werden.

FKRZ	K1		Fibrinkleber		Histoacryl		p-Wert
	7 Tage	21 Tage	7 Tage	21 Tage	7 Tage	21 Tage	
n	6	6	5	6	6	6	7 Tage: n.s. 21 Tage: ** $p \leq 0,01$: K1 vs. Fibrin.; * $p \leq 0,05$: Fibrin vs. Histo.; Rest n.s. <u>Histoacryl</u> <u>7vs21Tage</u> * $p \leq 0,05$
x	n.v.	1,38	0,10	0,13	0,07	0,96	
s	n.v.	0,23	0,10	0,09	0,07	0,23	
Median	n.v.	1,50	0,00	0,00	0,00	1,00	
Min	n.v.	0,60	0,00	0,00	0,00	0,20	
Max	n.v.	2,00	0,50	0,50	0,40	1,75	

Tab. 27: Auswertung des Parameters „Fremdkörperriesenzelle“ am 7. bzw. 21. Tag post OP, eingeteilt in K1-, Fibrinkleber- und Histoacrylgruppe (Histologie Scoresystem vgl. Material- & Methodenteil)

n = Anzahl der ausgewerteten Präparate
s = SEM
FKRZ = Fremdkörperriesenzelle

x = Mittelwert
n.s. = nicht signifikant ($= p > 0,05$)
n.v. = nicht vorhanden

Nach 21 Tagen zeigte sich ein hoch signifikanter Unterschied zwischen der K1- Gruppe und der Fibrinklebergruppe ($p \leq 0,01$ bei K1 vs. Fibrinkleber). Außerdem ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Histoacrylgruppe und der Fibrinklebergruppe ermitteln ($p \leq 0,05$ bei Fibrinkleber vs. Histoacryl) (s. Abb. 25). Zudem zeigte sich innerhalb der Histoacrylgruppen, dass es nach 21 Tagen zu einem signifikanten Anstieg an FKRZ kam.

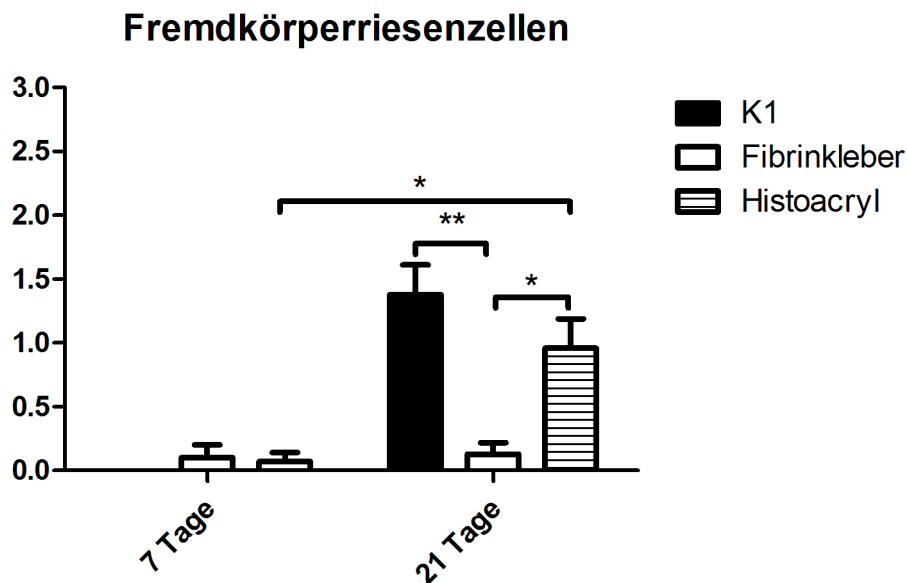


Abb. 25: Graphische Darstellung des Parameters „Fremdkörperriesenzellen“ in der H.E. - Färbung am 7. und 21.postoperativen Tag, eingeteilt in die drei Klebergruppen (dargestellt als Mittelwert (x) mit SEM)

(7 Tage: n.s.)

21 Tage: **: $p \leq 0,01$ bei K1 vs. Fibrinkleber; *: $p \leq 0,05$ bei Fibrinkleber vs. Histoacryl; $p > 0,05$ bei K1 vs. Histoacryl

7 Tage vs. 21 Tage: *: $p \leq 0,05$ bei Histoacryl 7 Tage vs. 21 Tage)

In Abbildung 26 und 27 erkennt man die häufige Präsenz der Fremdkörperriesenzelle rund um die Kleberreste in der Reaktionszone.

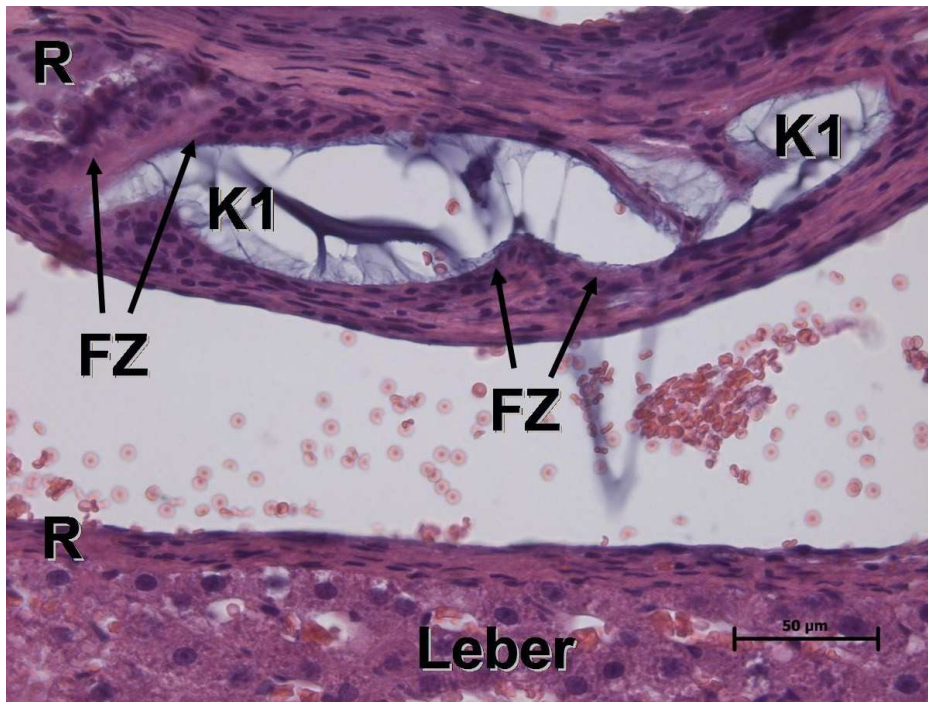


Abb. 26: Repräsentativer mikroskopischer Befund von K1 (W1-B-30) nach 21 Tagen, H.E.- Färbung, 400er Vergrößerung

R = Reaktionszone K1 = Kleber K1
FZ = Fremdkörperriesenzelle

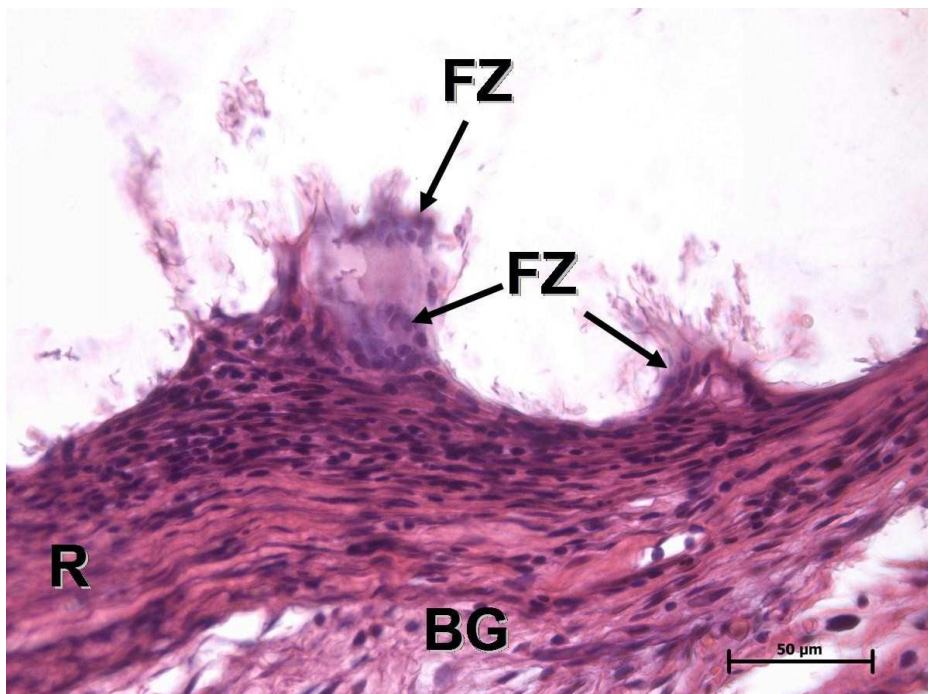


Abb. 27: Repräsentativer mikroskopischer Befund der Histoacrylgruppe (W4-B-27) nach 21 Tagen, H.E. - Färbung, 400er Vergrößerung

R = Reaktionszone FZ = Fremdkörperriesenzellen
BG = Bindegewebe (mit Fibroblasten + Fibrozyten)

Die Auswertung der FKRZ ergab abschließend, dass alle verwendeten Kleber nach 7 Tagen keine deutliche Reaktion verursachen. Nach 21 Tagen sieht der Trend jedoch anders aus: bei der K1- und Histoacrylgruppe wurde ein starker Anstieg an Riesenzellen festgestellt, so dass sich die Ergebnisse signifikant von der Fibrinklebergergruppe unterscheiden. Dies lässt auf ein chronisches Fremdkörpergeschehen und eine schlechtere Abbaubarkeit der beiden Kleber vermuten.

Nekrosen

Unter dem Begriff Nekrose versteht man den Tod der Zelle, der durch Schädigung der Zelle, Kontakt mit Toxinen oder Krankheitserregern hervorgerufen werden kann. Im Gegensatz zur Apoptose, die einen kontrollierten Zelluntergang beschreibt, spricht man bei der Nekrose von einem unkontrollierten Vorgang, bei dem der Inhalt der Zelle in die Umgebung abgegeben wird.

Das Auftreten von Nekrosen ist somit ein Hinweis auf eine Reaktion, die durch Gewebekleber ausgelöst werden kann, und die mit dem Zelltod endet. Daher wurde dieser Parameter zur Auswertung mit herangezogen.

Sowohl nach 7 als auch nach 21 Tagen ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Klebergruppen ermitteln (s. Tab. 28). Insgesamt konnten bei allen 3 Klebergruppen nur sehr geringe Werte bestimmt werden.

Nekrosen	K1		Fibrinkleber		Histoacryl		p-Wert
	7 Tage	21 Tage	7 Tage	21 Tage	7 Tage	21 Tage	
n	6	6	5	6	6	6	n.s.
x	0,31	0,03	0,30	0,10	0,17	n.v.	
s	0,10	0,03	0,10	0,10	0,07	n.v.	
Median	0,25	0	0,33	0	0,17	n.v.	
Min	0	0	0	0	0	n.v.	
Max	0,67	0,17	0,50	0,60	0,50	n.v.	

Tab. 28: Auswertung des Parameters „Nekrosen“ am 7. bzw. 21. Tag post OP, eingeteilt in K1-, Fibrinkleber- und Histoacrylgruppe (Histologie Scoresystem vgl. Material- & Methodenteil)

n = Anzahl der ausgewerteten Präparate
s = SEM
n.v. = nicht vorhanden

x = Mittelwert
n.s. = nicht signifikant (= $p > 0,05$)

Granulome

Die Anwesenheit von Granulomen in der Reaktionszone deutet auf eine offensichtliche Reaktion der Leber auf den Kleber/Kleberabbau hin. Unter Granulomen versteht man knotige, entzündungsbedingte Gewebeneubildungen, die z.B. durch schwer abbaubare Fremdmaterialien im Organismus entstehen können. Fremdkörper bedingte Reaktionen nennt man auch Fremdkörperreaktion, welche eine charakteristische Eigenschaft der chronischen, inflammatorischen Antwort auf ein fremdes Biomaterial darstellen (KLINGE et al., 2010).

Sowohl nach 7 als auch nach 21 Tagen ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Klebergruppen ermitteln (s. Tab. 29, Abb. 28).

Granulom	K1		Fibrinkleber		Histoacryl		p-Wert
	7 Tage	21 Tage	7 Tage	21 Tage	7 Tage	21 Tage	
n	6	6	5	6	6	6	<u>7 Tage:</u> * $p \leq 0,05$: K1 vs. Histo.; Rest n.s. <u>21 Tage:</u> ** $p \leq 0,01$: K1 vs. Fibrin.; Rest n.s.. <u>7 vs 21 Tage:</u> ** $p \leq 0,01$ Fibrinkleber
x	1,69	1,23	1,03	0,15	0,80	0,74	
s	0,15	0,28	0,36	0,08	0,18	0,20	
Median	1,59	1,42	1,50	0,09	0,83	0,71	
Min	1,33	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	
Max	2,33	2,00	1,83	0,50	1,33	1,50	

Tab. 29: Auswertung des Parameters „Nekrosen“ am 7. bzw. 21. Tag post OP, eingeteilt in K1-, Fibrinkleber- und Histoacrylgruppe (Histologie Scoresystem vgl. Material- & Methodenteil)

n = Anzahl der ausgewerteten Präparate
s = SEM

x = Mittelwert
n.s. = nicht signifikant

Zum Zeitpunkt 7 Tage zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der K1- und der Histoacrylgruppe ($p \leq 0,05$ bei K1 vs. Histoacryl) (s. Tab. 29 und Abb. 28).

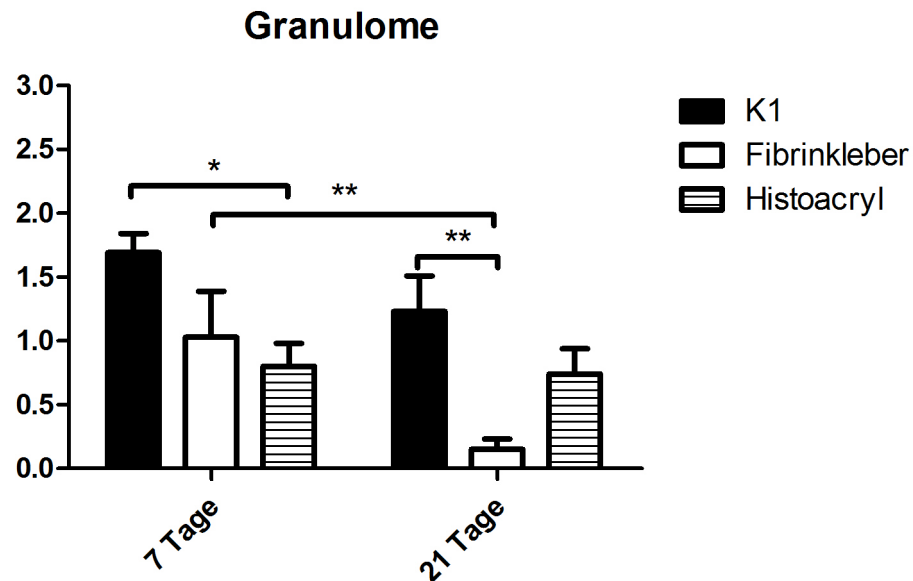


Abb. 28: Graphische Darstellung des Parameters „Granulome“ in der H.E.-Färbung am 7. und 21. postoperativen Tag, eingeteilt in die drei Klebgruppen (dargestellt als Mittelwert (x) mit SEM)

(7 Tage: * : $p \leq 0,05$ bei K1 vs. Histoacryl; $p > 0,05$ bei K1 vs. Fibrinkleber und Fibrinkleber vs. Histoacryl)

21 Tage: ** : $p \leq 0,01$ bei K1 vs. Fibrinkleber; * : $p \leq 0,05$ bei Fibrinkleber vs. Histoacryl; $p > 0,05$ bei K1 vs. Histoacryl;

7 Tage vs. 21 Tage: ** : $p \leq 0,01$ bei Fibrinkleber, $p > 0,05$ bei K1 und Histoacryl)

Nach 21 Tagen zeigte sich ein hoch signifikanter Unterschied zwischen der K1- und der Fibrinklebergergruppe ($p \leq 0,01$ bei K1 vs. Fibrinkleber) (s. Tab. 29, Abb. 28).

Im zeitlichen Verlauf erkennt man nur in der Gruppe, bei der Fibrinkleber verwendet wurde, eine signifikante Abnahme an Granulomen (s. Abb. 28).

In Abbildung 29 + 30 sind repräsentative mikroskopische Befunde der K1- und Histoacrylgruppe abgebildet. Sie zeigen deutlich das Vorhandensein eines Granuloms. Außerdem lässt sich in Abb. 30 eine zellreiche Reaktionszone (u.a. Makrophagen, Plasmazellen, Bindegewebe mit Fibroblasten und Fibrozyten) erkennen.

Die Ergebnisse der Granulomauswertung ähneln sich im Vergleich mit der FKRZ-Auswertung. Nach 21 Tagen haben wir die meisten Granulome in der K1- und Histoacrylgruppe gefunden, in der Fibrinklebergergruppe hingegen nur vereinzelte. Dies entspricht einer Auseinandersetzung des Gewebes mit dem Fremdmaterial. Aber auch nach 7 Tagen erkennt man eine deutliche Reaktion aller Klebertypen mit dem Gewebe.

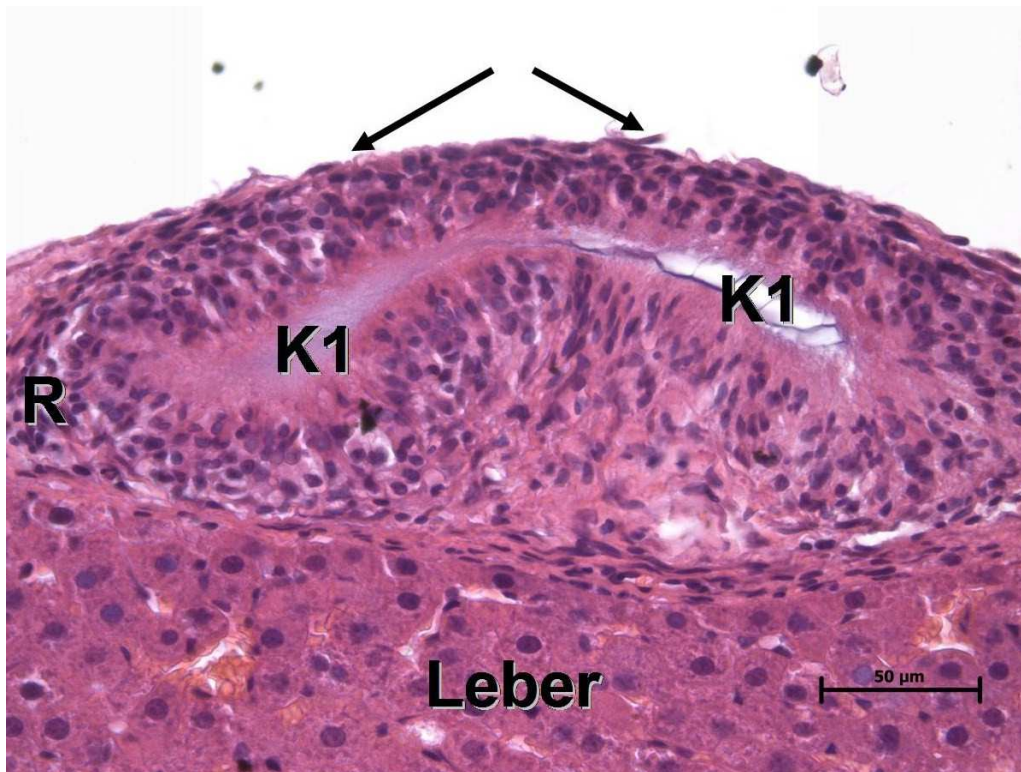


Abb. 29: Repräsentativer mikroskopischer Befund der K1-Gruppe (W1-B-39) nach 21 Tagen, H.E.-Färbung, 400er Vergrößerung

P = Plasmazelle
G = Granulom

K1 = Kleber K1
R = Reaktionszone

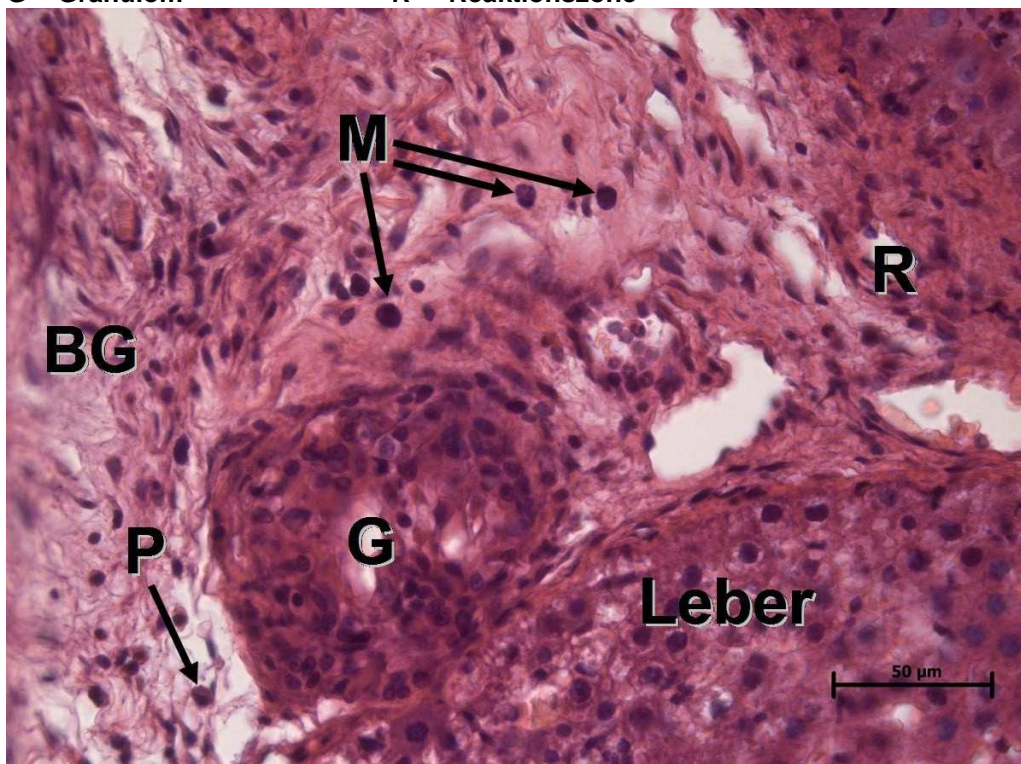


Abb. 30: Repräsentativer mikroskopischer Befund der Histoacrylgruppe (W4-B-27) nach 21 Tagen, H.E.-Färbung, 400er Vergrößerung

L = Leber
G = Granulom

P = Plasmazelle
M = Makrophage

R = Reaktionszone
BG = Bindegewebe

3.7.2. Sirius Red

3.7.2.1. Bestimmung des Kollagen I/III-Quotienten

Der Kollagen I/III-Quotient lässt auf das Verhältnis von Typ I – und Typ III-Kollagen im Regenerationsgewebe schließen. Zu Beginn der Geweberegeneration dominiert das instabilere Kollagen Typ III, das im Laufe des Heilungsprozesses durch das stabilere Kollagen Typ I ersetzt wird. So bleiben von den anfänglichen 80% des Typ III Kollagens in der endgültigen Narbe nur noch 20% bestehen. Somit erwartet man im Verlauf des Heilungsprozesses eine erhöhte Belastbarkeit der Narbe und eine Zunahme des Kollagen-Quotienten. Nur bei einem bestmöglichen Verhältnis kann eine stabile Narbe entstehen, daher kann ein nicht optimaler Quotient z.B. auf Wundheilungsstörungen hindeuten (FRIEDMAN et al., 1993, KLINGE et al., 2000).

Sowohl nach 7, als auch nach 21 Tagen ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den 3 Klebgruppen bestimmen (s. Tab. 30 und Abb. 31).

Bei Betrachtung der 7-Tage-Ergebnisse fällt dennoch auf, dass die K1-Gruppe einen höheren Quotienten aufwies als die Fibrinkleber- oder die Histoacrylgruppe.

Nach 21 Tagen zeigte sich in allen Gruppen ein relativer Anstieg des Quotienten. Ein höchst signifikanter Anstieg konnte in der Gruppe, in der Fibrinkleber verwendet wurde, nachgewiesen werden. Außerdem wurde hier der höchste Maximumwert im Vergleich zu den anderen Gruppen bestimmt.

Gruppe		n	x ± s	p-Wert
K1	7 Tage	6	58,82 ± 28,99	7 Tage: n.s. 21 Tage: n.s.
	21 Tage	6	66,03 ± 51,16	
Fibrinkleber	7 Tage	5	17,50 ± 5,17	----- Fibrinkleber: 7 Tage vs. 21 Tage: p < 0,001
	21 Tage	6	74,06 ± 51,82	
Histoacryl	7 Tage	6	12,78 ± 2,73	
	21 Tage	6	24,71 ± 6,81	

Tab. 30: Auswertung des Kollagen Typ I/III-Verhältnisses am 7. bzw. 21. postoperativen Tag, eingeteilt in die drei Klebgruppen (Histologie Scoresystem vgl. Material- & Methodenteil)

n = Anzahl der ausgewerteten Präparaten

x = Mittelwert

s = SEM

ns = nicht signifikant (= p > 0,05)

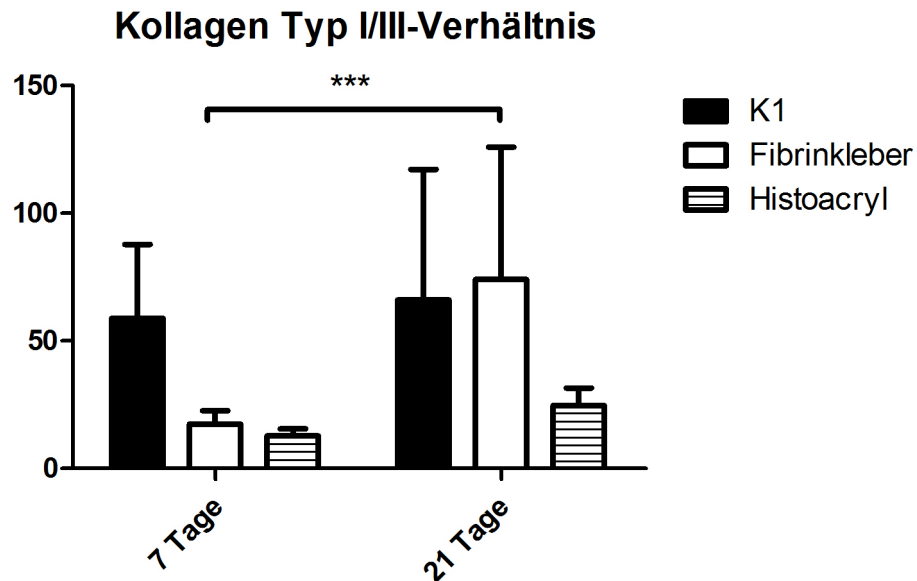


Abb. 31: Graphische Darstellung des Kollagen Typ I/III – Verhältnisses am 7. und 21. postoperativen Tag, eingeteilt in die drei Klebergruppen (dargestellt als Mittelwert (x) mit SEM) (7 und 21 Tage: n.s.; Fibrinkleber: ***: $p < 0,01$ bei Fibrinkleber 7 Tage vs. Fibrinkleber 21 Tage.)

3.7.3. Immunhistologie

3.7.3.1. TUNEL-Färbung

TUNEL steht für “Terminale Desoxyribosyl-Transferase mediated d-UTP Nick End Labeling” und erlaubt die Auswertung von apoptotischen Zellen (CLAVIEN et al., 2000).

Es wurden sowohl in der Reaktionszone (s. Tab. 31, Abb. 32) zwischen Leber und Kleber als auch in der der Reaktionszone angrenzenden Leberzone (s. Tab. 32, Abb. 33) der Prozentsatz der positiven apoptotischen Zellen ermittelt.

In der Reaktionszone zeigten sich nach 7 Tagen keine signifikanten Unterschiede im Gegensatz zu den 21-Tage-Gruppen. Hier konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der K1 und der Histoacrylgruppe errechnet werden (K1 vs. Histo = $p < 0,05$). Die Fibrinklebergruppe zeigte einen hoch signifikanten Unterschied zur Histoacrylgruppe (Fibrinkleber vs. Histoacryl = $p < 0,01$).

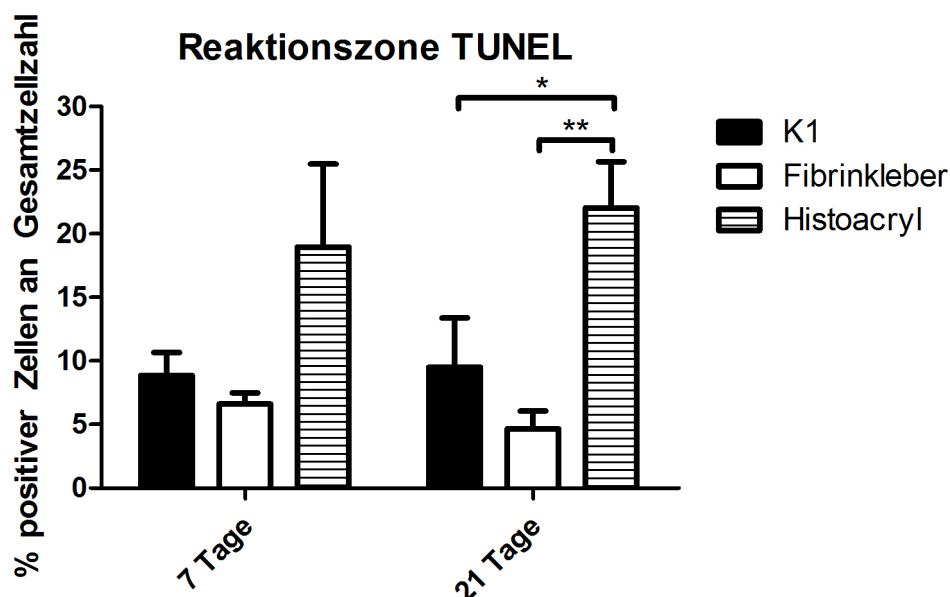


Abb. 32: Graphische Darstellung der immunhistochemischen TUNEL-Färbung – prozentualer Anteil der positiven Zellen im Bereich der Reaktionszone am 7. und 21. postoperativen Tag, eingeteilt in die drei Klebergruppen (dargestellt als Mittelwert (x) mit SEM)

(7 Tage: n.s.)

21 Tage: *: $p \leq 0,05$ bei K1 vs. Histoacryl; **: $p \leq 0,01$ bei Fibrinkleber vs. Histoacryl;

n.s.: $p > 0,05$ bei K1 vs. Fibrinkleber

7 Tage vs. 21 Tage: n.s.)

Gruppe		n	$\bar{x} \pm s$	p-Wert
K1	7 Tage	6	$8,86 \pm 1,81$	7 Tage: n.s. 21 Tage: K1 vs. Histo = $p < 0,05$ Fibrin vs. Histo = $p < 0,01$
	21 Tage	6	$9,51 \pm 3,88$	
Fibrinkleber	7 Tage	5	$6,62 \pm 0,87$	
	21 Tage	6	$4,66 \pm 1,40$	
Histoacryl	7 Tage	6	$18,97 \pm 6,51$	7 Tage vs 21 Tage: n.s.
	21 Tage	6	$22,04 \pm 3,61$	

Tab. 31: Auswertung und Darstellung des immunhistochemischen Scores (in %; prozentualer Anteil der positiven Zellen an der Gesamtzellzahl) der TUNEL-Färbung im Bereich der Reaktionszone zwischen Leber und Kleber am 7. bzw. 21 Tag post OP, eingeteilt in die K1-, Fibrinkleber- und Histoacrylgruppe

n = Anzahl der ausgewerteten Präparate
s = SEM

x = Mittelwert
n.s. = nicht signifikant (= $p > 0,05$)

In Abb. 34 und 35 ist ein repräsentativer immunhistochemischer Befund der K1-Gruppe nach 7 Tage und 21 Tagen abgebildet.

Gruppe		n	$\bar{x} \pm s$	p-Wert
K1	7 Tage	6	$10,37 \pm 1,58$	7 Tage: n.s. 21 Tage: n.s. ----- K1: 7 Tage vs. 21 Tage: $p < 0,01$
	21 Tage	6	$8,25 \pm 6,35$	
Fibrinkleber	7 Tage	5	$11,56 \pm 4,05$	
	21 Tage	6	$4,50 \pm 1,75$	
Histoacryl	7 Tage	6	$15,84 \pm 5,03$	
	21 Tage	6	$18,47 \pm 5,71$	

Tab. 32: Auswertung und Darstellung des immunhistochemischen Scores der TUNEL-Färbung im Bereich der Leber (Übergang zur Reaktionszone) am 7. bzw. 21. Tag post OP, eingeteilt in die K1-, Fibrinkleber- und Histoacrylgruppe (in %)

n= Anzahl der ausgewerteten Präparate
s= SEM

\bar{x} = Mittelwert
n.s. = nicht signifikant (= $p > 0,05$)

Bei beiden Zeitpunkten konnte im Bereich der Leber kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Klebergruppen ermittelt werden (s. Tab. 32). Nur beim Vergleich von 7 und 21 Tagen der K1-Gruppe zeigte sich ein hoch signifikanter Unterschied (s. Abb. 33).

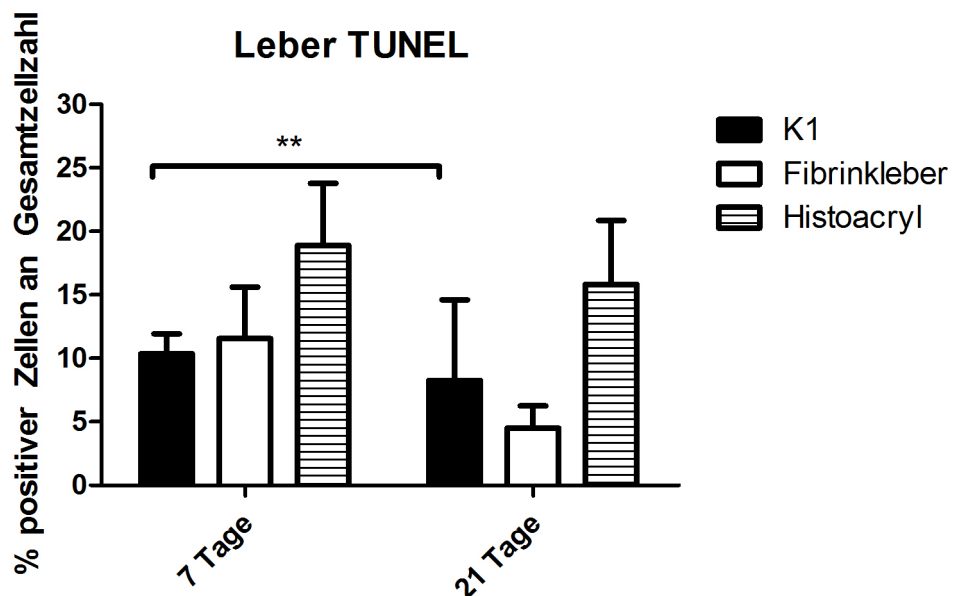


Abb. 33: Graphische Darstellung der immunhistochemischen TUNEL-Färbung – prozentualer Anteil der positiven Zellen am 7 und 21. postoperativen Tag, eingeteilt in die drei Klebergruppen (dargestellt als Mittelwert (\bar{x}) mit SEM)

(7 Tage: n.s..

21 Tage: n.s.

7Tage vs. 21 Tage: K1: **: $p < 0,01$ bei 7 Tage vs. 21 Tage; Fibrinkleber und Histoacryl: n.s.)

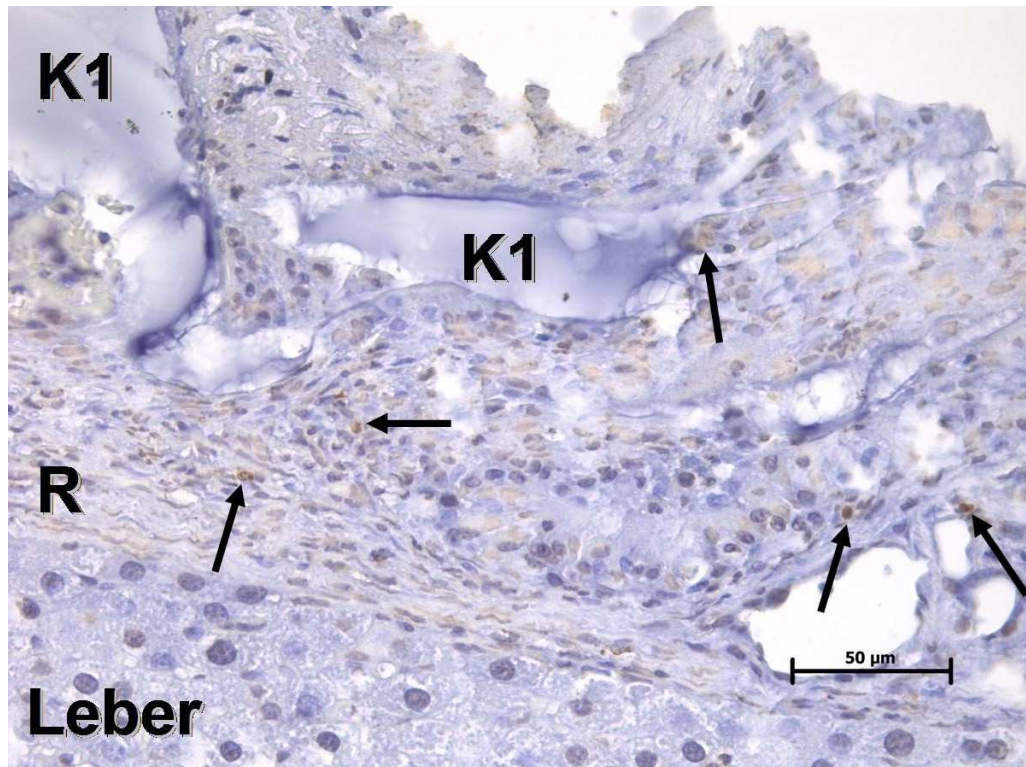


Abb. 34: Immunhistochemische TUNEL-Färbung im Übergang Kleber/ Lebergewebe (Reaktionszone) der K1-Gruppe am 7. postoperativen Tag (Tier W1-A-16), 400fache Vergrößerung (Pfeile zeigen einige Beispiele der positiven Zellen an), R = Reaktionszone

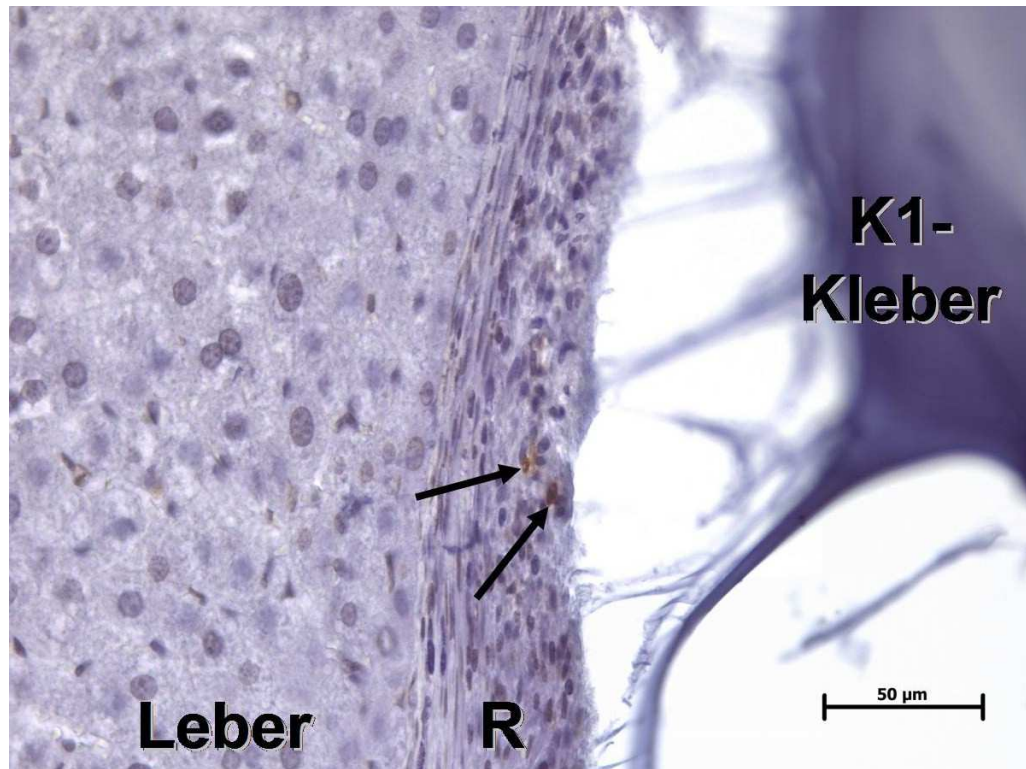


Abb. 35: Immunhistochemische TUNEL-Färbung im Übergang Kleber/ Lebergewebe (Reaktionszone) der K1-Gruppe am 21. postoperativen Tag (Tier W1-B-30), 400fache Vergrößerung (Pfeile zeigen einige Beispiele der positiven Zellen an), R = Reaktionszone

Zusammenfassend zeigte sich die stärkste Reaktion, das bedeutet, die meisten apoptotischen Zellen bei der Verwendung von Histoacryl, sowohl im Bereich der Reaktionszone als auch im angrenzenden Lebergewebereich.

3.7.3.2. Ki67 - Färbung

Mit Hilfe der Ki67-Färbung wurden alle Zellen angefärbt, die sich gerade im proliferativen Zellzyklus befanden (GERLACH et al., 1997; SCHOLZEN, 2000); daher versteht man diesen Parameter auch als Proliferationsmarker.

Es wurden – ebenso wie bei der TUNEL-Färbung – sowohl in der Reaktionszone (s. Tab. 33, Abb. 36) zwischen Leber und Kleber als auch in der der Reaktionszone angrenzenden Leberzone (s. Tab. 34; Abb. 37) der Prozentsatz der positiv proliferativen Zellen ermittelt.

Gruppe		n	$\bar{x} \pm s$	p-Wert
K1	7 Tage	6	$2,56 \pm 0,57$	7 Tage: n.s. 21 Tage: K1 vs. Fibrin: $p < 0,05$ ----- K1: $p < 0,001$ bei 7Tage vs. 21Tage
	21 Tage	6	$1,56 \pm 0,08$	
Fibrinkleber	7 Tage	5	$1,55 \pm 0,57$	
	21 Tage	6	$4,07 \pm 0,93$	
Histoacryl	7 Tage	5	$1,49 \pm 0,54$	
	21 Tage	6	$2,67 \pm 0,25$	

Tab. 33: Auswertung und Darstellung des immunhistochemischen Scores (in %; prozentualer Anteil der positiven Zellen an der Gesamtzellzahl) der Ki67-Färbung im Bereich der Reaktionszone zwischen Leber und Kleber am 7.bzw. 21 Tag post OP, eingeteilt in die K1-, Fibrinkleber- und Histoacrylgruppe

n = Anzahl der ausgewerteten Präparate
s = SEM

\bar{x} = Mittelwert
n.s. = nicht signifikant (= $p > 0,05$)

Im direkten Vergleich ergaben sich nach 7 Tagen keine signifikanten Unterschiede in der Reaktionszone zwischen den drei Klebergruppen. Nach 21 Tagen zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen K1 und dem Fibrinkleber ($p < 0,05$).

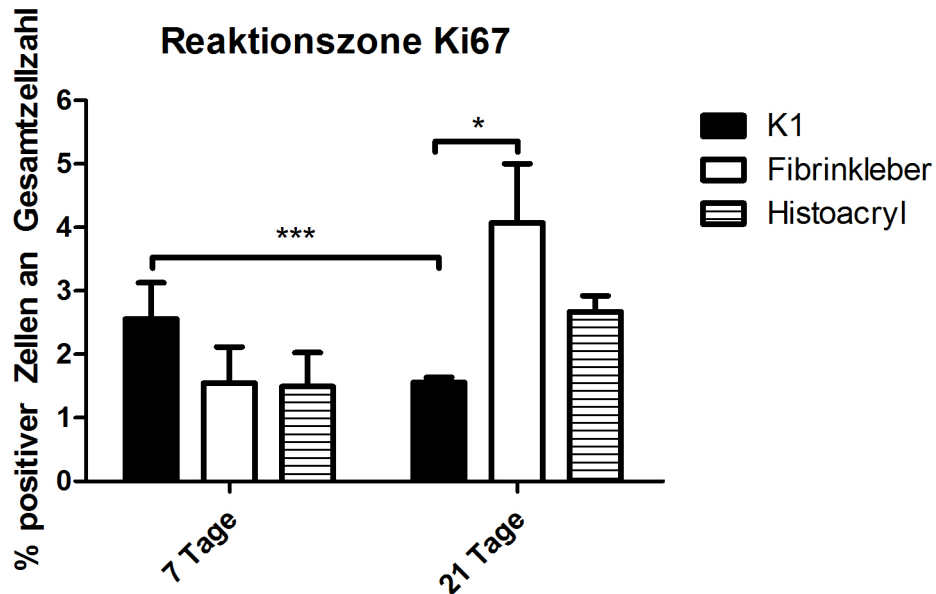


Abb. 36: Graphische Darstellung der immunhistochemischen Ki67-Färbung – prozentualer Anteil der positiven Zellen in der Reaktionszone am 7. und 21. postoperativen Tag, eingeteilt in die drei Klebegruppen (in %) (dargestellt als Mittelwert (x) mit SEM)

(7 Tage: n.s.

21 Tage: *: $p \leq 0,05$ bei K1 vs. Fibrinkleber; n.s. : $p > 0,05$ bei Fibrinkleber vs. Histoacryl und bei K1 vs. Histoacryl)

7Tage vs. 21 Tage: K1: ***: $p < 0,001$ bei 7 Tage vs. 21 Tage; n.s. : $p > 0,05$ bei Fibrinkleber + Histoacryl)

Beobachtet man die Veränderungen der einzelnen Klebertypen nach 7 bzw. 21 Tagen, so ließ sich lediglich bei der K1-Gruppe eine höchst signifikante Abnahme an positiven Zellen ausmachen (s. Abb. 36).

Gruppe		n	x ± s	p-Wert
K1	7 Tage	6	0,15 ± 0,07	7 Tage: n.s. 21 Tage: Fibrin vs. Histo: $p < 0,05$
	21 Tage	6	0,75 ± 0,23	
Fibrinkleber	7 Tage	5	0,20 ± 0,10	K1: $p \leq 0,05$ bei 7Tage vs. 21 Tage; Fibrin: $p < 0,01$ bei 7 Tage vs. 21 Tage
	21 Tage	6	1,78 ± 0,65	
Histoacryl	7 Tage	5	0,35 ± 0,13	
	21 Tage	6	0,16 ± 0,10	

Tab. 34: Auswertung und Darstellung des immunhistochemischen Scores der Ki67-Färbung im Bereich der Leber (Übergang zur Reaktionszone) am 7. bzw. 21. Tag post OP, eingeteilt in die K1-, Fibrinkleber- und Histoacrylgruppe

n= Anzahl der ausgewerteten Präparate
s= SEM

x = Mittelwert
n.s. = nicht signifikant (= $p > 0,05$)

In der äußeren Leberzone, der Zone, die der sog. Reaktionszone am nächsten ist, ließen sich zwischen 7-Tage-Gruppen keine signifikanten Unterschiede ermitteln (s. Tab. 34, Abb. 37). Die ausgezählten Werte lagen dicht beieinander.

Nach 21 Tagen ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Fibrinkleber- und der Histoacrylgruppe ($p < 0,05$).

Bei K1 und Fibrinkleber kommt es zu signifikanten Anstiegen der Werte im Vergleich der 7- und 21-Tage-Gruppen (s. Abb. 37).

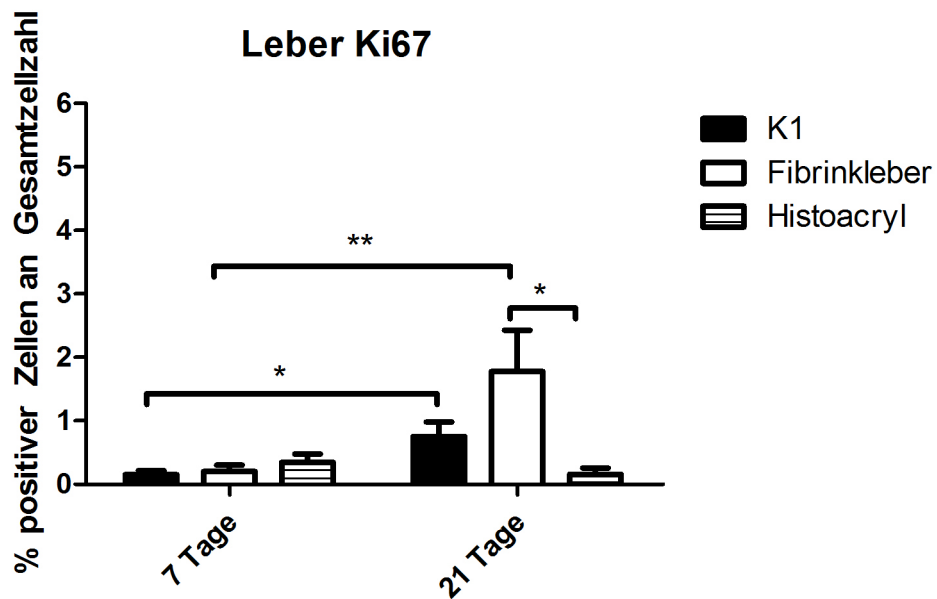


Abb. 37: Graphische Darstellung der immunhistochemischen Ki67-Färbung – prozentualer Anteil der positiven Zellen am 7 und 21. postoperativen Tag, eingeteilt in die drei Klebergruppen (dargestellt als Mittelwert (\bar{x}) mit SEM)

(7 Tage: n.s..

21 Tage: *: $p \leq 0,05$ bei Fibrinkleber vs. Histoacryl; n.s. : $p > 0,05$ bei K1 vs. Fibrinkleber und K1 vs. Histoacryl)

7 Tage vs. 21 Tage: K1: *: $p \leq 0,05$ bei 7 Tage vs. 21 Tage; Fibrinkleber: **: $p < 0,01$; n.s.: $p > 0,05$ bei Histoacryl 7 Tage vs. 21 Tage)

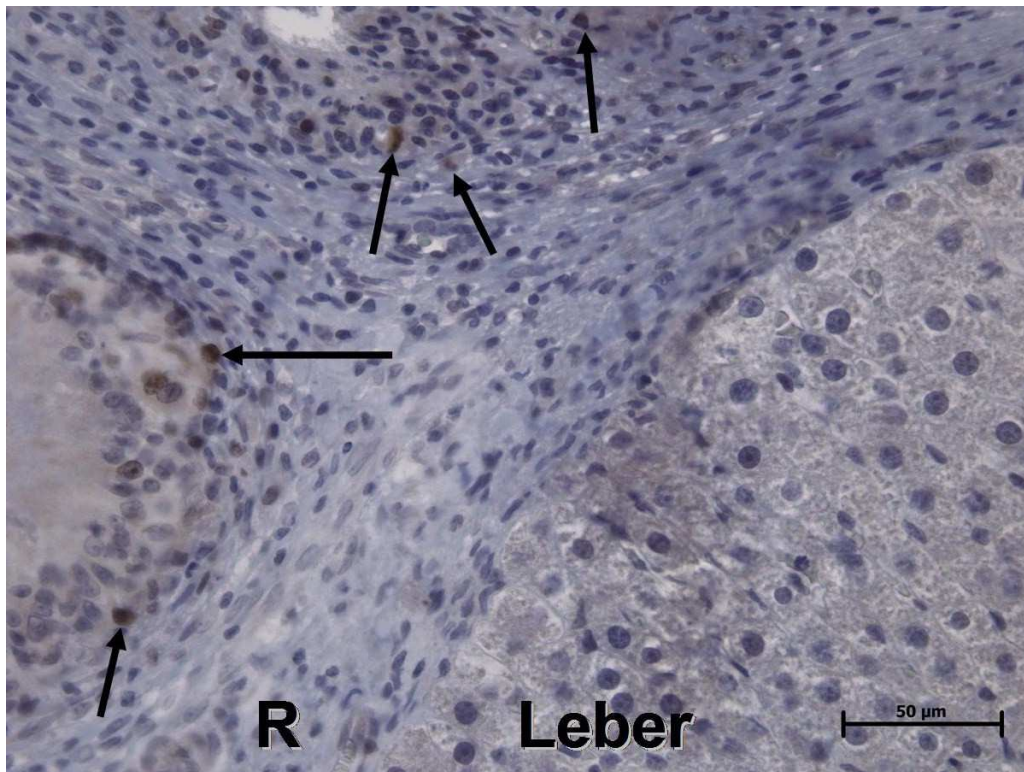


Abb. 38: Immunhistochemische Ki67-Färbung im Übergang Kleber/ Lebergewebe (Reaktionszone) der K1-Gruppe am 7. postoperativen Tag (Tier W1-A-16), 400fache Vergrößerung (Pfeile zeigen einige Beispiel der positiven Zellen an); R = Reaktionszone

In Abb. 38 ist ein repräsentativer immunhistochemischer Befund der Ki67-Färbung der K1-Gruppe nach 7 Tage abgebildet.

Die Auswertung der positiven Zellen der Ki67-Färbung erbrachte kein eindeutiges Ergebnis. Die Proliferation der Zellen in der Reaktionszone nach Benutzung von K1 zeigte einen deutlichen Abfall zwischen 7 und 21 Tagen, was erwartet wurde. Der Anstieg in den beiden anderen Gruppen wurde nicht erwartet und deutet auf eine aktivere Reaktion nach 21 Tagen hin.

3.7.3.3. Cyclooxygenase-2-Färbung (COX-2-Färbung)

Cyclooxygenase-2 gehört zu den Cyclooxygenasen, die eine wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen spielen und deren Synthese von Entzündungsprozessen abhängt.

Es wurden sowohl in der Reaktionszone (s. Tab. 35, Abb. 39) zwischen Leber und Kleber als auch in der der Reaktionszone angrenzenden Leberzone (s. Tab. 36, Abb. 40) der Prozentsatz der COX-2 positiven Zellen ermittelt.

Gruppe		n	$\bar{x} \pm s$	p-Wert
K1	7 Tage	6	$0,40 \pm 0,11$	7 Tage: n.s. 21 Tage: n.s. ----- Histoacryl: 7 Tage vs. 21 Tage: $p < 0,01$
	21 Tage	6	$0,46 \pm 0,10$	
Fibrinkleber	7 Tage	5	$0,45 \pm 0,17$	
	21 Tage	6	$0,78 \pm 0,11$	
Histoacryl	7 Tage	6	$1,90 \pm 1,04$	
	21 Tage	6	$0,83 \pm 0,16$	

Tab. 35: Auswertung und Darstellung des immunhistochemischen Scores (in %; prozentualer Anteil der positiven Zellen an der Gesamtzellzahl) der COX-2-Färbung im Bereich der Reaktionszone zwischen Leber und Kleber am 7. bzw. 21 Tag post OP, eingeteilt in die K1-, Fibrinkleber- und Histoacrylgruppe

n = Anzahl der ausgewerteten Präparate
s = SEM

\bar{x} = Mittelwert
n.s. = nicht signifikant (= $p > 0,05$)

Es gab sowohl nach 7 als auch nach 21 Tagen keine signifikanten Unterschiede der COX-2 Nachweise zwischen den drei getesteten Klebern. Der Anteil an positiven Zellen sank in der Histoacrylgruppe allerdings signifikant innerhalb von 7 auf 21 Tage ($p < 0,01$).

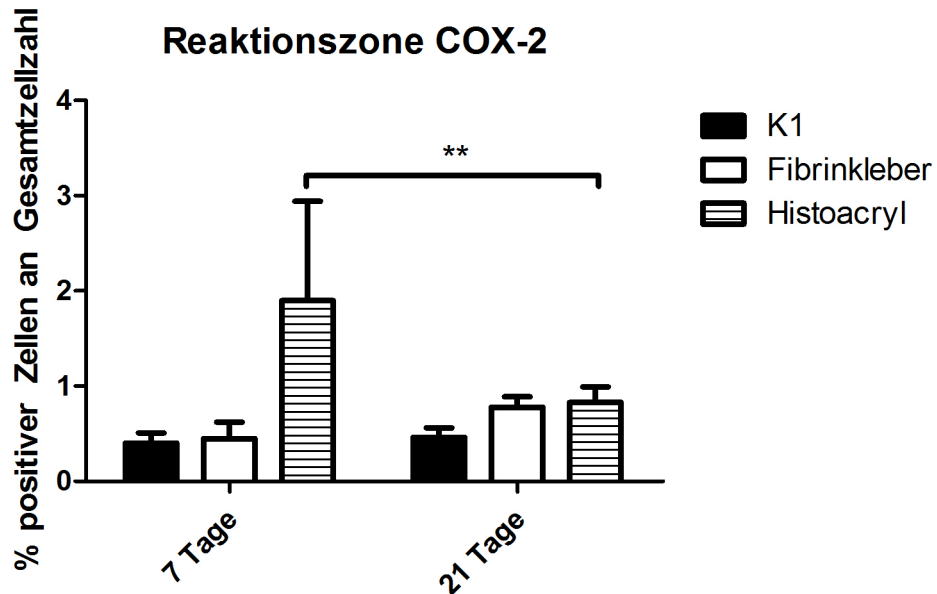


Abb. 39: Graphische Darstellung der immunhistochemischen COX-2-Färbung – prozentualer Anteil der positiven Zellen in der Reaktionszone am 7. und 21. postoperativen Tag, eingeteilt in die drei Klebergruppen (in %) (dargestellt als Mittelwert (x) mit SEM)

(7 und 21 Tage: n.s.)

7Tage vs. 21 Tage: Histoacryl: **: $p < 0,01$; K1 und Fibrinkleber: n.s.)

Die Auszählung im Bereich der Leber ergab das gleiche Bild. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen ermittelt werden, allerdings wurde ein signifikanter Unterschied zwischen 7 und 21 Tagen in der Histoacrylgruppe ($p < 0,01$) (s. Tab. 20 und Abb. 23) gefunden.

Gruppe		n	$\bar{x} \pm s$	p-Wert
K1	7 Tage	6	$0,42 \pm 0,20$	7 Tage: n.s. 21 Tage: n.s. ----- Histoacryl: 7 Tage vs. 21 Tage: $p < 0,01$
	21 Tage	6	$0,50 \pm 0,34$	
Fibrinkleber	7 Tage	5	0 ± 0	
	21 Tage	6	$0,56 \pm 0,13$	
Histoacryl	7 Tage	5	$0,72 \pm 0,48$	
	21 Tage	6	$0,16 \pm 0,08$	

Tab. 36: Auswertung und Darstellung des immunhistochemischen Scores der COX-2- Färbung im Bereich der Leber (Übergang zur Reaktionszone) am 7. bzw. 21. Tag post OP, eingeteilt in die K1-, Fibrinkleber- und Histoacrylgruppe

n= Anzahl der ausgewerteten Präparate
s= SEM

\bar{x} = Mittelwert
n.s. = nicht signifikant (= $p > 0,05$)

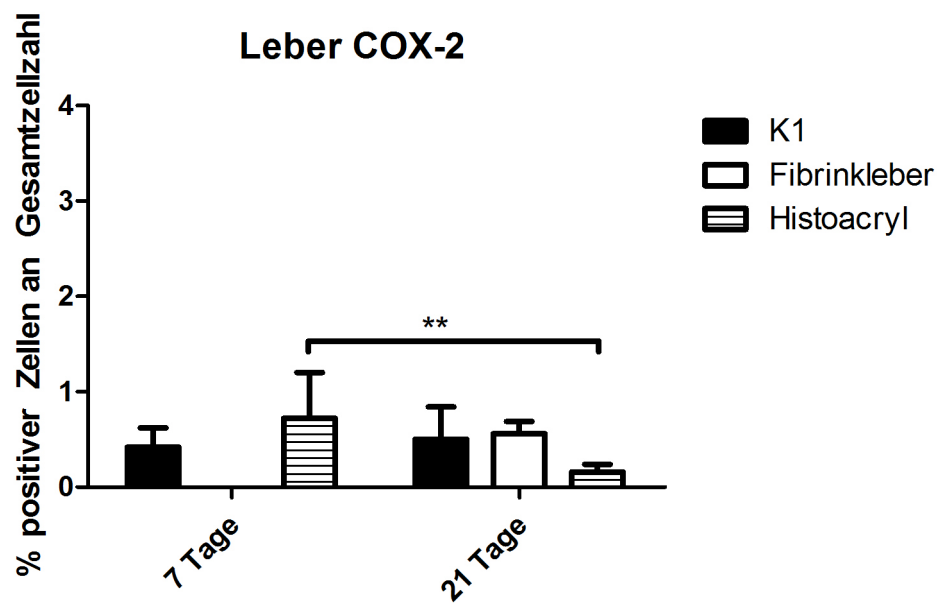


Abb. 40: Graphische Darstellung der immunhistochemischen COX-2-Färbung – prozentualer Anteil der positiven Zellen am 7. und 21. postoperativen Tag, eingeteilt in die drei Klebergruppen (dargestellt als Mittelwert (x) mit SEM)

(7 und 21 Tage: n.s.)

7 Tage vs. 21 Tage: Histoacryl: **: $p < 0,01$; K1 und Fibrinkleber: n.s.)

In Abb. 41 ist ein repräsentativer immunhistochemischer Befund der Reaktionszone der K1-Gruppe nach 21 Tagen abgebildet.

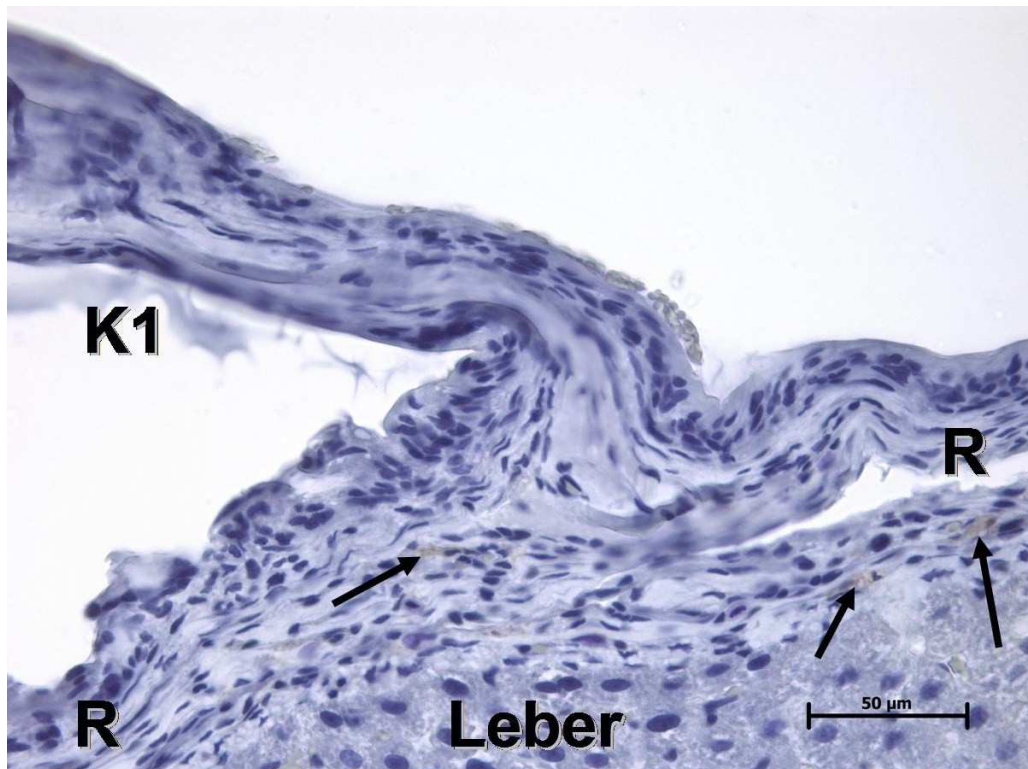


Abb. 41: Immunhistochemische COX-2-Färbung im Übergang Kleber/ Lebergewebe (Reaktionszone) der K1-Gruppe am 21. postoperativen Tag (Tier W1-B-39), 400fache Vergrößerung (Pfeile zeigen einige Beispiel der positiven Zellen an); R = Reaktionszone

Wie erwartet, zeigte sich die ausgeprägteste Reaktion bei der COX-2-Färbung bei der Anwendung von Histoacryl.

Auffällig ist außerdem, dass der Prozentsatz positiver Zellen bei der K1- und Fibrinklebergruppe im Vergleich nach 7 und 21 Tagen ansteigt, wohingegen die Werte der Histoacrylgruppe signifikant abnehmen, sowohl in der Reaktions- als auch in der Leberzone.

3.7.3.4. CD68-Färbung (Makrophagen)

Unter CD68 versteht man ein Transmembranprotein, das hauptsächlich von Makrophagen exprimiert wird und somit einen Entzündungsmarker darstellt.

Es wurden sowohl in der Reaktionszone (s. Tab. 37) zwischen Leber und Kleber als auch in der der Reaktionszone angrenzenden Leberzone (s. Tab. 38, Abb. 42) der Prozentsatz der CD68 positiven Zellen ermittelt.

Gruppe		n	$\bar{x} \pm s$	p-Wert
K1	7 Tage	6	$5,26 \pm 0,94$	n.s.
	21 Tage	6	$2,56 \pm 0,63$	
Fibrinkleber	7 Tage	5	$6,49 \pm 0,89$	
	21 Tage	6	$2,40 \pm 0,50$	
Histoacryl	7 Tage	5	$7,07 \pm 1,37$	
	21 Tage	6	$3,76 \pm 1,48$	

Tab. 37: Auswertung und Darstellung des immunhistochemischen Scores (in %; prozentualer Anteil der positiven Zellen an der Gesamtzellzahl) der CD68-Färbung im Bereich der Reaktionszone zwischen Leber und Kleber am 7. bzw. 21 Tag post OP, eingeteilt in die K1-, Fibrinkleber- und Histoacrylgruppe

n = Anzahl der ausgewerteten Präparate \bar{x} = Mittelwert
s = SEM n.s. = nicht signifikant (= $p > 0,05$)

Sowohl nach 7 als auch nach 21 Tagen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei der Auswertung in der Reaktionszone (s. Tab. 37).

Auch bei der vergleichenden Betrachtung der Werte nach 7 und 21 Tagen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Gruppe		n	$\bar{x} \pm s$	p-Wert
K1	7 Tage	6	$1,48 \pm 0,51$	7 Tage: n.s. 21 Tage: n.s. ----- K1 und Histoacryl: 7 Tage vs. 21 Tage: $p < 0,01$
	21 Tage	6	$0,23 \pm 0,09$	
Fibrinkleber	7 Tage	5	$0,62 \pm 0,22$	
	21 Tage	6	$0,61 \pm 0,27$	
Histoacryl	7 Tage	5	$0,90 \pm 0,27$	
	21 Tage	6	$0,09 \pm 0,06$	

Tab. 38: Auswertung und Darstellung des immunhistochemischen Scores der CD68- Färbung im Bereich der Leber (Übergang zur Reaktionszone) am 7. bzw. 21. Tag post OP, eingeteilt in die K1-, Fibrinkleber- und Histoacrylgruppe

n = Anzahl der ausgewerteten Präparate \bar{x} = Mittelwert
s = SEM n.s. = nicht signifikant (= $p > 0,05$)

In der äußeren Leberzone konnten nach 7 oder 21 Tagen ebenfalls keine Signifikanzen bestimmt werden. Alle Gruppen nahmen im Hinblick auf die zwei Versuchszeitpunkte ab. Signifikante Unterschiede im Hinblick auf den Verlauf

(7/21 Tage) fanden sich allerdings in der K1- ($p < 0,01$) und in der Histoacrylgruppe ($p < 0,01$).

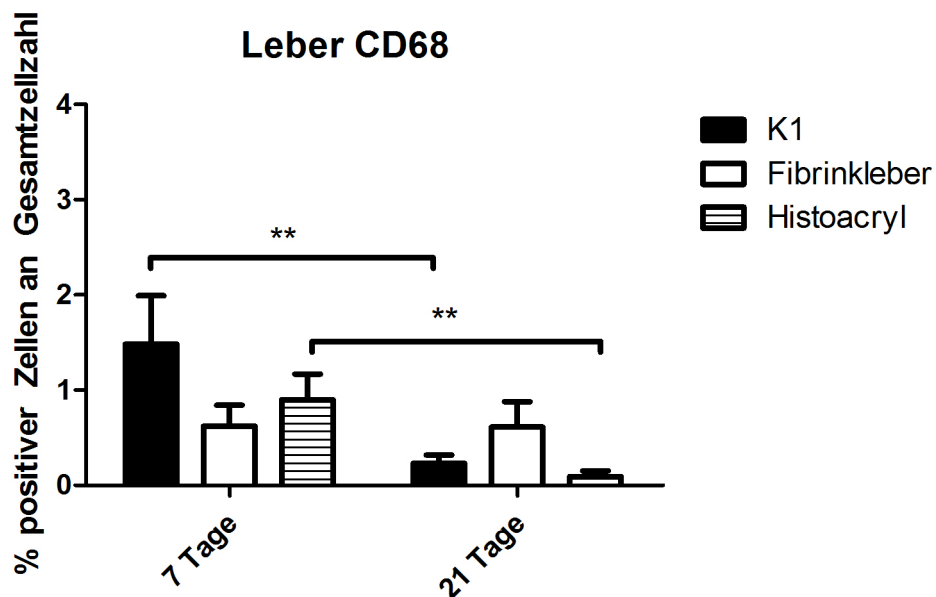


Abb. 42: Graphische Darstellung der immunhistochemischen CD68-Färbung – prozentualer Anteil der positiven Zellen am 7. und 21. postoperativen Tag, eingeteilt in die drei Kleberguppen (dargestellt als Mittelwert (\bar{x}) mit SEM)

(7 und 21 Tage: n.s.)

7 Tage vs. 21 Tage: K1 und Histoacryl: **: $p < 0,01$; Fibrinkleber: n.s.)

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Werte aller Gruppen im Vergleich 7 und 21 Tage abnahmen, wobei es eine Signifikanz bei der K1- und Histoacrylgruppe in der Leberzone gab. Hier zeigte sich auch die einzige Ausnahme: der Anteil an positiven Zellen in der Fibrinkleberggruppe blieb konstant.

3.7.3.5. Myeloperoxidase-Färbung (MPO)

Myeloperoxidase (MPO) ist ein Enzym, das durch Degranulation von neutrophilen Granulozyten freigesetzt wird und daher als Messgröße der neutrophilen Infiltration bzw. Aktivität ausgewählt wurde.

Die positiven Zellen wurden nur im Bereich der Reaktionszone bestimmt (s. Tab. 39), da im Bereich der Leber die Auszählung gegen 0 verlief und daher aus der Wertung genommen wurde.

Gruppe		n	$\bar{x} \pm s$	p-Wert
K1	7 Tage	6	$1,40 \pm 0,17$	n.s.
	21 Tage	6	$1,45 \pm 0,20$	
Fibrinkleber	7 Tage	5	$1,56 \pm 0,21$	
	21 Tage	6	$1,39 \pm 0,12$	
Histoacryl	7 Tage	5	$1,81 \pm 0,31$	
	21 Tage	6	$1,59 \pm 0,21$	

Tab. 39: *Auswertung und Darstellung des immunhistochemischen Scores (in %; prozentualer Anteil der positiven Zellen an der Gesamtzellzahl) der MPO-Färbung im Bereich der Reaktionszone zwischen Leber und Kleber am 7. bzw. 21 Tag post OP, eingeteilt in die K1-, Fibrinkleber- und Histoacrylgruppe*

n = Anzahl der ausgewerteten Präparate
s = SEM

\bar{x} = Mittelwert
n.s. = nicht signifikant (= $p > 0,05$)

Zu keinem Zeitpunkt ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen oder innerhalb der Gruppen.

4. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen neu entwickelten, vollsynthetischen Gewebekleber auf Polyurethanbasis der Firma Bayer MaterialScience AG hinsichtlich seiner Biokompatibilität und Biofunktionalität (Wirksamkeit) zu überprüfen. Dazu wurden zunächst *in-vitro* Untersuchungen durch eine Firma (im Auftrag der Bayer MaterialScience AG) und anschließend *in-vivo* –Tests im Rahmen dieser Arbeit im Institut für Versuchstierkunde, Aachen, durchgeführt.

Auf Grundlage der Biomaterialtestung nach dem Medizinproduktegesetz (MPG) wurde als erstes die biologische Verträglichkeit des Zwei-Komponentenklebers entsprechend der DIN EN ISO 10993 beurteilt. Anschließend konnte auf Basis der *in-vitro* Ergebnisse eine tierexperimentelle Studie realisiert werden. Der zu testende Gewebekleber wurde bis dato noch nie *in-vivo* bezüglich seines Hämostase- und Klebeverhaltens sowie der Gewebeverträglichkeit getestet und bewertet. An einem Leberresektionsmodell in der Ratte konnte diese Fragestellung überprüft werden, ebenso die Beurteilung der Vor- und Nachteile des Klebers beim Handling. Zudem sollte die „non-inferiority“ = Nicht-Unterlegenheit des neuen Klebers im Vergleich zur anerkannten Standardtherapie (Fibrinkleber und Histoacryl) gezeigt werden.

4.1. *in-vivo* – Biologische Sicherheitsprüfung an einem Leberteilresektionsmodell

Das Medizinproduktegesetz setzt vor der Anwendung und Zulassung eines neuen Medizinproduktes eine biologische Bewertung voraus, damit mögliche Risiken vor dem Einsatz am lebenden Organismus ausgeschlossen werden können. Nachdem *in-vitro* die Bioverträglichkeit des Gewebeklebers nachgewiesen werden konnte (durch die Firma Bayer MaterialScience AG, s. Kapitel 1.5.2.), sollte im *in-vivo* -Versuch die biologische Sicherheit gezeigt werden, d.h. es wurden die Ergebnisse der Testung (Laborparameter, Blutungszeit, intraabdominale Adhäsion, Histologie usw.) wissenschaftlich ausgewertet und diskutiert. Es sollte im Idealfall nachgewiesen werden, dass der Einsatz des neuen, vollsynthetischen Klebers die Ergebnisse nicht negativ beeinflusst hat und somit als biologischer sicher gelten kann. Zusätzlich sollte die „non-inferiority“ des neuen Gewebeklebers im Vergleich

zum klinischen Standard gezeigt werden, zu diesem Zweck wurden die Ergebnisse von K1 mit denen der zwei anderen verwendeten Gewebekleber (Fibrinkleber und Histoacryl) verglichen und bewertet.

K1 wird bei Raumtemperatur, Histoacryl® im Kühlschrank aufbewahrt und beide sind sofort einsetzbar. Der Fibrinkleber Beriplast® wird bei 2-8°C gelagert und muss vor Anwendung erst vorbereitet und aufgezogen werden. Dies stellt einen Nachteil gegenüber den anderen beiden Gewebeklebern dar, da eine nicht geübte Person in einer Notfallsituation eine gewisse Zeit benötigt, um den Kleber gebrauchsfähig zu machen. K1 ist durch die mitgelieferten Applikationsdüsen sofort einsatzfähig, ebenso Histoacryl, das durch die Verpackung in sterilen Ampullen für den OP-Einsatz jederzeit einsatzbereit ist.

Das Handling von K1 konnte während seines Einsatzes am Leberresektionsmodell als sehr gut bewertet werden. Die mitgelieferte Zwei-Komponenten-Mischspritze und die sofort einsatzfähigen Applikatoren ließen eine gute Handhabung der Spritze, eine exakte Dosierbarkeit und genaues Auftragen des Klebers zu. Zudem erwies sich die Konsistenz (Viskosität ähnlich zähfließendem Honig) des Gewebeklebers als geeignet. Beim Auftragen auf die blutende Leberwunde kam es zum zügigen Abbinden des Klebers und zur raschen Blutstillung (vgl. 3.1.2. und 4.1.4.). Leider verstopften die Applikatoren sofort nach dem Auftragen durch die Aushärtung des Klebers, so dass bei evtl. Nachauftragen immer ein neuer Applikator nötig war. Das gleiche Problem trat jedoch ebenfalls beim Fibrinkleber auf. Bei der Verwendung von Histoacryl spielte dies keine Rolle, da das Monomer in einer durchgängigen Ampulle geliefert wird und erst beim Kontakt mit Wasser auspolymerisiert und somit in dem Gefäß bis zur weiteren Verwendung flüssig bleibt.

4.1.1. Mögliche Indikationen des neuen Gewebeklebers

Ein möglicher Einsatzbereich des neuen, vollsynthetischen Klebers liegt im Gebiet der Blutstillung. Der Gewebekleber könnte äußerlich oder innerlich zur Anwendung kommen, und dort die normalen chirurgischen Maßnahmen zur Blutstillung positiv unterstützen.

Ein ebenfalls denkbare Einsatzgebiet wäre im militärischen Einsatz zu sehen. Das US Militär, beispielsweise, gibt Millionen von Dollar aus, um ein geeignetes und

sicheres Hämostatikum zu finden, das man im Feldeinsatz benutzen kann, um den verwundeten Soldaten die Möglichkeit zu geben, sich selber durch eine Erst- und Notversorgung zu retten und vor dem Verblutungstod zu bewahren, bis ein Transport in ein Feldkrankenlager möglich ist.

Der Kleber könnte aber auch im Bereich der Gewebevereinigung zum Einsatz kommen. Als „Sekundenkleber“ könnte das lästige und vor allem für Kinder schmerzvolle Nähen überflüssig werden. Eine lokale Betäubung, eine Naht sowie das Fäden ziehen würden wegfallen und durch die fehlenden Stichkanäle der Naht wären die entstehenden Narben kaum sichtbar und das kosmetische Ergebnis verbessert. Außerdem würde der auf Wunden aufgetragene Kleber als Keimbarriere dienen.

4.1.2. Auswahl des Tiermodells

Bei der Auswahl des *in-vivo* Modells haben wir uns für die Ratte und ein Leberresektionsmodell entschieden, da in der internationalen Literatur überwiegend über Versuche an Ratten berichtet wird (vgl. Kapitel 1.6.), das Modell somit schon etabliert ist und daher eine Vergleichbarkeit gegeben ist.

Davidson et al. haben 2000 zwar z.B. ein ähnliches Resektionsmodell am Schwein durchgeführt, oder Nur et al. (2005) an Kaninchen, dennoch haben wir uns für die Ratte entschieden, da sie auch aus Haltungsründen Vorteile bietet und das Tierschutzgesetz Versuche am phylogentisch niedrigsten Tier verlangt.

Wir haben uns zudem gegen die kleinere Spezies Maus entschieden, da zum einen etablierte Versuchsmodelle an der Ratte vorliegen und zum anderen die Ratte der Maus als Versuchstier in diesem Fall durch seine Größe überlegen ist. Wie auch bei toxikologischen Untersuchungen können bei der Ratte mehr und größere Proben gewonnen werden und somit besser ausgewertet werden.

Die Überlebenszeitpunkte 7 und 21 Tage orientieren sich, ebenfalls wie das Leberresektionsmodell, an den Literaturangaben, die gefunden wurden (z.B. DEMIREL et al., 2008) und an der Tatsache, dass Higgins und Anderson 1931 herausfanden, dass die Leberregeneration im Rattenmodell sehr schnell abgeschlossen ist. Nach einer 2/3 Hepatektomie ist die Regeneration schon nach ca. 14 Tagen abgeschlossen, wohingegen der Prozess beim Menschen im Schnitt 6 Monate dauert (BUCHER, 1991; MARKUS et al., 2000). Zudem wird nach 7-10

Tagen ein Maximum der Entzündungsreaktion im Hinblick auf die Kleber-/ Leberreaktion erwartet, wobei die Adhäsionen nach 21 Tagen voraussichtlich hoch sind.

Der neue Gewebekleber K1 wurde im Vergleich zu Fibrinkleber und Histoacryl getestet, da gleichzeitig mit der Biokompatibilität und der biologischen Sicherheitsprüfung *in-vivo* die non-inferiority (= Gleichwertigkeit) des neuen Klebers gegenüber dem klinischen Standard (LANGE et al., 2007) gezeigt werden sollte. Fibrinkleber ist in der Klinik vielseitig einsetzbar und wird mittlerweile in über 400 Anwendungsbereichen verwendet (DUCKREY-FISKAEN et al., 2007). Histoacryl ist zwar in erster Linie nur für den äußeren epidermalen Wundverschluss und als Sklerosierungstherapie großer Ösophagus- und Fundusvarizen zugelassen, wurde im Versuchsplan dennoch als klinischer Standard eingesetzt und als solcher verglichen, da Histoacryl häufig wegen Mangel an Alternativen in der Praxis in individuellen Situationen im OP verwendet wird (FOTIADIS et al., 2005).

Biondo-Simoes haben 2007 ebenfalls ein neues Hämostatikum an einem Leberresektionsmodell an der Ratte im Vergleich zu Fibrinkleber und Cyanoacrylat getestet. Fotiadis et al. (2005) beschrieben die Verwendung von Cyanoacrylaten in der Abdominalchirurgie, allerdings nur in Situationen, bei denen Blutungen schwer zu kontrollieren sind und nachdem alle konventionellen Möglichkeiten ausgeschöpft waren. Außerdem benutzte die Arbeitsgruppe Dilege et al. (2010) Histoacryl, um Meshes zur Hernienstabilisierung zu fixieren.

4.1.3. Körpergewicht

Das Körpergewicht der Versuchstiere wurde am OP-Tag und am Versuchsende nach 7 oder 21 Tagen bestimmt. Da es sich bei den verwendeten Ratten um wachsende und nicht adulte Tiere gehandelt hat, wurde angenommen, dass diese während der Versuchsdauer physiologischerweise zunehmen müssen. Da das Körpergewicht ein wichtiges Kriterium bei der Belastung von Tieren bei chronischen Versuchen ist und u.a. in die Beurteilung der Abbruchkriterien (GV-Solas, Tierärztliche Vereinigung für Tierärzte) mit einfließt, lässt die Abnahme des Gewichtes Rückschlüsse auf eine erhöhte/ hohe Belastung des Tieres zu. Zudem können sich toxische/ nicht verträgliche Stoffe negativ auf das Körpergewicht auswirken und die Gewichtskontrolle ist daher, aufgrund der OECD-Richtlinien bei toxikologischen

Studien zu bestimmen (vgl. z.B. OECD GL422; auch wenn die vorliegende Studie keine toxikologische Studie war).

Beim Vergleich der Gewichtsverläufe der drei Klebergruppen untereinander ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Alle Ratten haben die OP und die Versuchsdauer überlebt, und haben innerhalb von 7 bzw. 21 Tagen zugenommen.

Vergleicht man das Ausgangsgewicht der 21-Tage-Gruppen mit dem erreichten Gewicht nach der Dauer des Versuches, so ließen sich signifikante Gewichtszunahmen innerhalb (aber nicht zwischen den drei Klebergruppen) der verschiedenen Klebergruppen erkennen. Wie aber oben schon erwähnt, wurde dies bei den jungen, wachsenden Ratten erwartet und belegt damit, dass die Versuchstiere keiner erhöhten Belastung durch die verwendeten Kleber ausgesetzt waren und so zunehmen konnten.

Die Arbeitsgruppe um Batista (2008) verglich Nähte und Histoacryl in einem Wundheilungsmodell am Abdomen und verwendete dafür 250-400g schwere Wistarratten. Als Überlebenszeitpunkte wurden 7 und 14 Tage gewählt und die Gewichte wurden am OP- und Finaltag bestimmt. Hier konnte unabhängig von der Versuchsgruppe gezeigt werden, dass die wachsenden Tiere im Schnitt sogar abnahmen und nicht zunahmen. Die Autoren führten dies auf Effekte der Narkose und postoperative metabolische Veränderungen zurück.

Andere Autoren, wie z.B. Biondo-Simoes et al. (2007), haben wie in der vorliegenden Studie männliche Wistarratten mit einem Gewicht von ca. 350g verwendet. Sie sind in der Veröffentlichung nicht mehr weiter auf den Gewichtsverlauf eingegangen (nur 7-Tage-Gruppe); ebenso die Arbeitsgruppe von Demirel et al. (2008). In dieser Studie wurden Ratten mit einem Gewicht von 160g eingesetzt (3-/10- und 20-Tage-Gruppe), die Analyse der Gewichtsentwicklung fehlt jedoch vollständig und kann daher nicht mit der vorliegenden Arbeit verglichen werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Tiere aus der aktuellen Studie keinem Narkose- oder postoperativen Stress unterlagen und sich daher keine Rückschlüsse auf eine erhöhte Belastung des Tieres schließen ließen.

4.1.4. Blutungszeit

Die Blutungszeit wurde bei dem vorliegenden Projekt während der Leberresektion bestimmt, in dem die Zeit zwischen Auftragung des Gewebeklebers und der Blutstillung gemessen und notiert wurde.

Da der Gewebekleber zum ersten Mal *in-vivo* eingesetzt wurde, war die Beurteilung dieses Parameters sehr wichtig, da wir herausfinden wollten, ob die *in-vitro* Vorversuche sich beim Resektionsmodell umsetzen ließen und ob die Anwendung des neu entwickelten Klebers somit den Erwartungen stand hält.

Nach Auftragen von K1 auf die Resektionswunde kam es zum schnellen Abbinden des Gewebeklebers und zu einer raschen Blutstillung ($12,8 \pm 2,7$ Sekunden). K1 brauchte allerdings im Vergleich zu den anderen zwei Klebergruppen, die längste Zeit um auszuhärten und effektiv die Blutung stillen zu können. Bei den Ergebnissen zeigte sich dadurch ein signifikanter Unterschied zwischen der Blutungszeit von K1 und Histoacryl ($2,7 \pm 0,2$ Sekunden). Die sehr kurze Blutungszeit im Falle von Histoacryl lässt sich durch die exotherme Reaktion des Cyanoacrylates erklären, das sehr schnell in Verbindung mit Flüssigkeiten (u.a. Blut) (RICHARDSON, 2004; CATON-RICHARDS, 2011) reagiert und die Wunde gewissermaßen „verätzt“ und verödet (SCHNEIDER, 2009). Es scheint ein Vorteil zu sein, dass die Zeit hier am kürzesten war, allerdings kann das Gewebe durch die hohen entstehenden Temperaturen zusätzlich geschädigt werden (LELLÉ, 2000; ASMUSSEN und SÖLLNER, 2000). Daher darf die im Vergleich etwas längere Blutungszeit der K1-Gruppe nicht allzu negativ bewertet werden. Trotz der längeren Zeit und dem tendenziell höherem Blutverlust überlebten alle K1-Tiere die Projektdauer. Das zeigt, dass der Blutverlust, obwohl er höher war als in den anderen Gruppen, im Verhältnis nicht immens oder lebensgefährdend groß war, so dass die Tiere dennoch auch ohne Veränderungen im Blutbild überlebten.

Biondo-Simoes et al. (2007) konnten mit ihrem Projekt an männlichen Wistarratten ebenfalls zeigen, dass Histoacryl im Vergleich zu Fibrinkleber und einem anderen neu entwickelten Kleber am schnellsten die Blutung an einer Leberverletzung stoppen konnte (20 vs. 60 vs. 360 Sekunden). Schnell bedeutet jedoch nicht, dass Histoacryl automatisch der beste Kleber ist, denn, wie oben beschrieben, ist die schnelle Polymerisierung des Materials mit Nachteilen behaftet, ebenso die Auswirkung auf das Gewebe (s. Histologieauswertung).

Zwischen den Gruppen, bei denen K1 und Fibrinkleber ($7,3 \pm 1,9$ Sek) zur Blutstillung verwendet wurde, wurden keine signifikanten Zeitunterschiede festgestellt. Fibrinkleber als Zwei-Komponentenkleber braucht, ebenso wie K1, einen gewissen Zeitraum um auszuhärten, um dann der Blutung Herr zu werden.

Die Arbeitsgruppe um Turner et al. (2002) hat die Zeitspanne ebenso wie in der vorliegenden Arbeit bestimmt und konnte darstellen, dass die Blutungszeit von Fibrinkleber bei der Leberresektion an einem Schafsmodell mit 497 ± 98 Sekunden zwischen der Zeit eines Kollagenschwammes und einem neuen Hämostatikum lag.

Trotz der Speziesdifferenz zu der vorliegenden Arbeit konnte also gezeigt werden, dass die Blutungszeit bei der Anwendung von Fibrinkleber im Hämostatikavergleich im Mittelfeld anzusiedeln ist und somit nicht die schnellste Blutstillung aufweist.

Dies konnten Nur et al. (2005) ebenfalls mit einem heparinisierten Kaninchenmodell belegen. Hier wurden drei verschiedene Fibrinkleber (darunter auch Beriplast®, welcher in unserer Arbeit verwendet wurde) an einem Leberresektionsmodell verglichen. Und es konnte gezeigt werden, dass Beriplast® mit einer mittleren Zeit von 169 ± 133 Sekunden zwischen den Zeiten der anderen beiden Fibrinkleber lag. Ähnliche Ergebnisse sind einer Veröffentlichung von Tovar et al. (1998) zu entnehmen. Hier wurde an einem Leberresektionsmodell an der Ratte Fibrinkleber gegen „Air Coagulation“ und Naht verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die Blutstillung bei der Naht am langsamsten verlief (346 ± 7 Sekunden) und Fibrinkleber mit 58 ± 2 Sekunden im Mittelfeld lag.

4.1.5. Blutverlust

Der Blutverlust während der Leberresektion ist genauso wichtig wie die Zeitspanne bis zur Blutstillung (DAVIDSON et al., 2000).

Der Blutverlust wurde bei der vorliegenden Studie intraoperativ bestimmt, indem ein vor OP gewogener Gazetupfer unter den linken Leberlappen platziert wurde, um das Blut der Resektionswunde aufzufangen. Die Arbeitsgruppe um Turner et al. (2002) hat diese Technik ebenfalls verwendet. Hier wurde auch vorher eine Kompresse gewogen und unter die anstehende Leberverletzung gelegt. Nach der Blutstillung wurde der blutgetränkte Tupfer gewogen und das Ausgangsgewicht abgezogen. Schwartz et al. (2004) verwendeten diese Methode gleichermaßen. Sie nahmen an, dass 1 ml Blut = 1 g entsprechen. 2005 veröffentlichten Nur et al. (2005) eine etwas

veränderte Technik: das Blut wurde mit einem Trichter und einem Plastiktube nach der Resektion aufgefangen und anschließend rechnerisch bestimmt. Davidson et al. (2000) wendeten eine veränderte Methode an, indem sie den resezierten Leberrand in einem bestimmten Zeitabstand 10 Minuten lang mit einer Kompresse abtupften und so den kompletten Blutverlust ermittelten.

Die von uns durchgeführte Methode wurde letztendlich ausgewählt, da sie uns am simpelsten und praktikabelsten erschien und im Vergleich zu den in der Literatur berichteten Methoden für uns die wenigsten Nachteile aufwies. Bei dem Verfahren von Davidson et al. (2000) z.B. kann durch das Abtupfen der Resektionsstelle mit einem Tupfer Blut in die Bauchhöhle verloren gehen, das dann nicht in die Wertung einfließt. Der größte Nachteil dieser Methode ist jedoch darin zu sehen, dass bei jedem Abtupfen der gebildete Blutkoagel entfernt werden kann, und somit das Ende der Blutungszeit nicht adäquat bestimmt werden kann.

Die von uns angewandte Methode hatte allerdings auch einen Nachteil: Es war nicht möglich nur das Blut der entstandenen Blutung aufzufangen, sondern es wurden zum Teil auch Kleberreste und Bauchhöhlenflüssigkeit mit gewogen. Da dies aber bei jedem Tier der Versuchsdurchführung der Fall war, kann davon ausgegangen werden, dass sich der gleiche Fehler für jede gemessene Blutmenge ergeben hat (systematischer Fehler) und somit bei der Auswertung vernachlässigt werden konnte. Die hier aufgezeigten Nachteile sind in der gängigen Literatur nicht beschrieben worden, werden jedoch wie in der vorliegenden Arbeit vorgelegen haben.

Im Gegensatz zur Blutungszeit konnten beim Blutverlust keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Klebergruppen festgestellt werden. Allerdings korrelieren die Werte mit den Werten der Blutungszeit. Die Gruppe, in der K1 verwendet wurde, zeigte neben der längsten Blutstillung auch den durchschnittlich höchsten Blutverlust auf. Die Tiere, die mit Fibrinkleber behandelt wurden, verloren im Schnitt weniger Blut als die K1-Gruppe jedoch mehr als die Histoacrylgruppe. Aufgrund dieser Ergebnisse erscheint die Anwendung von Histoacryl der Effektivste der drei Gewebekleber zu sein. Der geringe Blutverlust ist jedoch auf die kurze Blutungszeit zurückzuführen, die durch die schnelle und exotherme Reaktion des Cyanoacrylates verursacht wird, aber dennoch einen bedeutenden Nachteil bei der Anwendung dieses Klebers aufzeigt.

Die fehlende Signifikanz bei dieses Messparameters (Blutverlust) lässt sich auch dadurch erklären, dass K1 z.B. die Resektionsfläche vollständig bedeckte und trotz

längerer Blutstillungszeit das Blut nicht ungehindert in die Bauchhöhle gelang. Wir konnten durch den durchsichtigen Kleber die Blutungszeit gut beobachten und feststellen, dass das unter K1 eingeschlossene Blut nicht in die Bauchhöhle gelangte. Somit wurde es nicht aufgefangen und im Vergleich fiel der Blutverlust geringer aus als bei der Blutungszeit.

4.1.6. Reseziertes Leberstück

Wie bereits unter 4.1.2. erwähnt, orientiert sich das Tiermodell an Versuchsplänen aus der internationalen Literatur, somit wurde die atypische Leberresektion mit einer geraden Schere und per Augenmaß durchgeführt.

Trotz nicht standardisiertem Entfernen eines definierten Stückes des linken Leberlappenrandes konnte durch Wiegen der resezierten Leberstücken gezeigt werden, dass die Resektionsmenge bei allen Gruppen nahezu gleich war und sich nicht signifikant voneinander unterschied (K1: $0,261 \pm 0,019$ g; Fibrinkleber: $0,286 \pm 0,025$ g; Histoacryl: $0,288 \pm 0,012$ g).

Diese Ergebnisse können nicht mit der vorangegangenen Literatur verglichen werden, da dort Angaben zum resezierten Leberstück fehlen. Bei Nur et al. (2005) und Tovar et al. (1998) wird nur von einer Resektionsmenge von 4% des gesamten Lebergewichtes gesprochen. Bei der Schweinestudie von Davidson et al. (2000) werden als einzige genaue Zahlen angegeben, so wurden hier im Durchschnitt 70g der Leber entfernt. Allerdings erkennt man bei dieser Veröffentlichung hohe Standardabweichung, die auf ein scheinbar nicht standardisiertes Entfernen des Lebergewebes zurückzuführen sind.

4.1.7. Laborparameter

Unmittelbar vor der Leberresektion und am Finaltag des Versuchsmodells wurde den Ratten ca. 1 ml Blut aus der V. cava caudalis entnommen, um verschiedene Laborparameter bestimmen zu können. Die Arbeitsgruppe um Demirel et al. (2008) und Kalayci et al. (2010) haben ebenfalls an einem Leberresektionsmodell einen Gewebekleber getestet und dafür in gleicher Weise Blutproben entnommen und anschließend u.a. die Aminotransferasen AST und ALT bestimmt. Wir haben uns, wie die beiden erwähnten Autoren, für die venöse Blutentnahme aus der Bauchhöhle

entschieden, da das Abdomen aufgrund der Leberresektion sowieso eröffnet werden musste und wir so schnell Zugang zur Vena cava caudalis hatten.

Die Laborparameter wurden zum einen bestimmt, um einen Überblick über den Gesundheitszustand der Tiere zu gewinnen, zum anderen aber auch, da nach DIN EN ISO 10993-4 eine Prüfung auf Hämokompatibilität (Wechselwirkung von Blut mit Fremdoberflächen) erfolgen sollte. Damit sollte bewiesen werden, dass durch die Anwendung des Gewebeklebers keine Veränderungen der Laborparameter entstehen und die Anwendung als biologisch sicher anzusehen ist.

Um die Laborwerte am Finaltag mit Referenzwerten überprüfen zu können, wurden die Blutwerte, die am OP-Tag entnommen wurden (unabhängig von der Gruppeneinteilung) als Basis und somit als Referenzwerte angenommen. Die Werte der drei Klebergruppen wurden untereinander und mit dem Referenzwert verglichen.

Die Arbeitsgruppe Tovar et al. (1998) hat extra Kontrolltiere verwendet und bei diesen Tieren Blut abgenommen, um die gewonnenen Werte anschließend als Referenzwerte zu verwenden. Im Sinne des 3-R-Konzeptes (Replacement, Reduction, Refinement) (RUSSEL und BURCH, 1959) haben wir uns dafür entschieden, zusätzlich keine Tiere zu opfern, sondern sämtliche Blutwerte vor OP als Referenzwerte anzunehmen.

Bei den Parametern Erythrozytenanzahl, Hämoglobinwert, Hämatokrit, Leukozytenzahl, Thrombozyten und den Aminotransferasen AST und ALT wurden bei der vorliegenden Arbeit keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen und zwischen den einzelnen Gruppen und dem Referenzwert ermittelt. Damit konnten wir belegen, dass es zu keinem ersichtlichen Effekt auf die Leber oder Organismus der Tiere durch den Gebrauch der drei verschiedenen Gewebekleber gekommen ist.

Demirel et al. (2008) testeten ebenfalls an einem Leberresektionsmodell an der Ratte einen neuen Fibrinkleber im Vergleich zur herkömmlichen Naht und konnten in ihrer Veröffentlichung zeigen, dass es keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf die AST und ALT- Werte (Überlebenszeitpunkte 3, 10 und 20 Tage) gab. Dies spiegeln unsere Ergebnisse auch wider.

Tovar et al. (1998) haben im Zuge ihres Leberresektionsmodells nur das AST-Level und ein kleines Blutbild bestimmt. Sie konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen (Air Coagulation, Fibrinklinge und Naht) im Hinblick auf den AST-Wert feststellen, ebenso wie wir. Es zeigte sich allerdings bei

allen drei Gruppen, dass es im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer signifikanten Reduktion der Hämoglobinwertes und der Erythrozytenkonzentration kam. Diese Aussage konnten wir mit unserem Projekt nicht aufzeigen. Außerdem stieg der Leukozytenwert nach 3, 5 und 10 Tag signifikant in der Nahtgruppe. Auch diese Feststellung konnten wir nicht zeigen, so dass, wie oben bereits erwähnt, kein bemerkbarer, negativer, systemischer Effekt durch die drei Kleber auf unsere Versuchstiere nachweisbar war und die Anwendung daher im Hinblick auf die Blutparameter als biologisch sicher anzusehen ist.

Zusätzlich zu den oben genannten Blutwerten wurde der De-Ritis-Quotient von uns berechnet. In der vorangegangenen erwähnten Literatur ist dieser Wert nicht beachtet worden.

Der De-Ritis-Quotient wurde von de Ritis et al. (1957) eingeführt und bestimmt das Verhältnis zwischen der AST und ALT Konzentration, die im Serum vorkommt. Je kleiner der Quotient ist, desto geringer ist die Leberschädigung einzustufen. Ein höherer (>1) Quotient spricht für eine schwere Leberschädigung. Der Quotient von > 1 gilt allerdings nur im humanen Bereich. Zur (2005) und Boehm et al. (2007) zeigten in ihren Arbeiten, dass die Serumreferenzwerte der Aminotransferasen von männlichen Wistarratten wesentlich höher liegen als die Werte beim Menschen. Wenn der De-Ritis-Quotient der Referenzwerte der vorliegenden Arbeit ausgerechnet wird, erreicht der Wert im physiologischen Zustand der Ratten $1,15 \pm 0,03$. Der Quotient kann also auch zur Auswertung bei Wistarratten herangezogen werden, man sollte jedoch beachten, dass man andere Ausgangswerte betrachten muss.

Strubelt et al. haben 1970 schon bei einem Tiermodell mit Wistarratten beschrieben, dass der Anstieg von Aminotransaminasen im Serum kein ausreichender Beweis für eine Schädigung ist und daher immer der De-Ritis-Quotient für eine weitere Beurteilung herangezogen werden muss. Denn auch wenn die Leberwerte ansonsten im Referenzbereich liegen, kann ein erhöhter Quotient auf eine Schädigung hinweisen, da AST bei schweren Leberzellschäden stärker ansteigt als ALT und somit der Quotient zunimmt.

Bei der Berechnung des De-Ritis-Quotienten ergab sich im Vergleich der Gruppen untereinander kein signifikanter Unterschied, nur die Werte der Fibrinklebergergruppe unterschieden sich nach 7 Tagen signifikant im Hinblick auf den Referenzbereich. D.h. der Quotient der Fibrinklebergergruppe war signifikant höher ($1,41 \pm 0,08$) als der des Referenzbereiches ($1,15 \pm 0,03$), unterschied sich jedoch nicht signifikant von

den restlichen Gruppen. Eigentlich vermutet man beim Fibrinkleber, als einzigem biologischem Kleber beim vorliegenden Projekt, die schwächste Reaktion auf das Modellgewebe Leber. Es kann durch den beobachteten erhöhten De-Ritis-Quotienten vermutet werden, dass sich die Abbau- und Umbauprozesse des Fibrinklebers auf die Leberenzyme ausgewirkt haben und diese als Resultat dieser Prozesse angestiegen sind. Da der Quotient nur nach 7 Tagen signifikant abweicht, scheint es so, als würden diese Abläufe in der ersten Zeit nach der Resektion ablaufen, die dann nach 21 Tagen abgeschlossen und somit nicht mehr relevant sind. Diese Vermutung deckt sich mit der Aussage verschiedener Veröffentlichungen, da Fibrinkleber nach 5-7 Tage vollständig abgebaut ist und bei der Relaparotomie kaum noch zu finden ist (SHEPPARD et al., 1993).

Die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) wurde zur Beurteilung des endogenen Gerinnungssystems herangezogen (LUXEMBOURG et al., 2007). Es konnten keine signifikanten Unterschiede im Gruppenvergleich und im Vergleich zum Referenzwert ermittelt werden, nur K1 unterschied sich nach 21 Tagen hoch signifikant im Hinblick auf den Referenzbereich. Die aPTT von K1 war nach 21 Tagen mit $13,4 \pm 0,6$ Sekunden erheblich verkürzt. Der Referenzbereich betrug $21,3 \pm 1,0$ Sekunden. Leberfunktionsstörungen können zu einer verlangsamten Gerinnung, also zu einem erhöhten aPTT-Wert führen. Erniedrigte Werte können postoperativ vorkommen, aber v. a. bei mangelhafter Entnahmetechnik (THOMAS, 2005). Daher gehen wir bei der signifikanten Abweichung der K1-Werte nach 21 Tagen im Vergleich zum Referenzwerte davon aus, dass es Probleme bei der Probenentnahme gab und nicht bei der Verträglichkeit des Klebers, da dies zu einer Erhöhung der aPTT-Werte hätte führen müssen. Wir hatten tatsächlich zu Beginn der Studie Probleme, das richtige Verhältnis an Blutmenge und Citrat zu finden, um die Messungen überhaupt standardisiert durchführen zu können.

Abschließend konnte der verkürzte aPTT-Wert der K1-Gruppe im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht geklärt werden. Dafür wären weitere Tests notwendig.

4.1.8. Intraabdominelle Adhäsion

Intraabdominelle Adhäsionen (Verwachsungen, Narbengewebe) entstehen häufig nach intraabdominellen Eingriffen (Laparotomien, Laparoskopien) (HIRSCHELMANN et al., 2011), indem es zu Verletzungen des Peritoneums oder zur Traumatisierung

von Organen kommt, was zu Fibrinausschwitzungen führen kann (ELLIS, 1980). Solche Adhäsionen stellen eine ernstzunehmende Komplikation (es können intestinale Obstruktionen, Ileus, Bauchschmerzen, weibliche Infertilität etc. entstehen) (DUFFY, 1996; SOYBEL, 1997; HIRSCHELMANN et al., 2011) durch ihre hohe Inzidenz und hohe Mortalität (durch Ileus) dar (TREUTNER et al., 1989). Bestimmte Materialien oder Substanzen können die Ausbildung von Adhäsionen begünstigen, so dass z.B. der Einsatz von Nähten/ unterschiedlichen Gewebeklebern minimiert werden sollte (DE WILDE und TREW, 2007).

Bei der Untersuchung und Bestimmung der intraabdominellen Adhäsion in unserem Projekt wollten wir prüfen, inwiefern die verschiedenen verwendeten Gewebekleber Adhäsionen im Resektionsgebiet beeinflussen.

In verschiedenen Tiermodellen wurden zur Beurteilung der intraabdominellen Adhäsionen Bewertungsscores entwickelt. Verret et al. (1989) haben einen sogenannten makroskopisch-morphologischen-Adhäsions-Score (MAS) beschrieben, der die Adhäsionen in vier Stufen einteilen lässt: Grad 0 = keine Adhäsionen, Grad 1 = lokale Narbenformation, Grad 2 = Adhäsionsbande und Grad 4 = ausgiebige Adhäsionen. Bothin et al. (1999), Demirel et al. (2008) und Kalayci et al. (2010) haben bei ihren Studien den MAS von Verret et al. (1989) als Grundlage für ihre Auswertungen genommen. Die Arbeitsgruppe um Sheppard et al. (1993) haben einen modifizierten Score nach Verret et al. verwendet, und Nur et al. haben 2005 ein Leberresektionsmodell mit Kaninchen durchgeführt, um einen neuen Fibrinkleber hinsichtlich seiner Hämostasefähigkeit und der Adhäsionsausbildung zu beurteilen und verwendeten zur Adhäsionseinteilung den Score von Sheppard et al. (1993).

Wir haben uns bei der postoperativen Adhäsionsbeurteilung an dem Scoresystem von Verret et al. (1989) orientiert und eine semiquantitative Auswertung (nach dem subjektiven Ausmaß der Adhäsionen) in drei Gruppen (mild, moderate und severe) vorgenommen, da uns dieses System am übersichtlichsten und praktikabelsten erschien. Zur Vereinfachung haben wir Verret's Grad 0 mit unserem Grad 1 (mild) gleichgesetzt.

Mit unserer Untersuchung der drei Gewebekleber konnte gezeigt werden, dass sowohl nach 7 als auch nach 21 Tagen nach der Leberresektion die Anwendung von Fibrinkleber die geringsten intraabdominellen Adhäsionen verursachte. Die Ergebnisse der Fibrinklebergruppe unterschieden sich im Vergleich zum Gewebekleber K1 nicht signifikant, auch wenn zu erkennen ist, dass bei der

Benutzung von K1 tendenziell mehr postoperative Adhäsionen zu finden waren. Die Ratten, bei denen Histoacryl zur Blutstillung verwendet wurden, schnitten am schlechtesten ab. Kein einziges Tier, das mit Histoacryl behandelt wurde, konnte nach 7 oder 21 Tagen mit „mild“ beurteilt werden. So zeigten sich ein signifikanter Unterschied nach 7 Tagen und ein hoch signifikanter Unterschied zwischen der Fibrinkleber- und Histoacrylgruppe nach 21 Tagen. K1 und Histoacryl unterschieden sich nicht signifikant voneinander, aber die Ergebnisse verdeutlichen, dass K1 (wenn auch nicht signifikant) besser abschloss als Histoacryl.

Biondo-Simoes et al. (2007) haben ein neues Hämostatikum an einem Leberresektionsmodell an der Ratte im Vergleich zu Fibrinkleber und einem Cyanoacrylat getestet. Nach 7 Tagen wurden ebenfalls die intraabdominalen Adhäsionen ermittelt und es konnte, wie bei der vorliegenden Studie, gezeigt werden, dass das Cyanoacrylat in 100% der Fälle zu Adhäsionen und zum Teil zu schweren Adhäsionen geführt hat: es waren hier mehr Organe involviert als bei den anderen zwei Gruppen. Das gleiche Resultat ergab sich bei unserer Anwendung mit Histoacryl: in den meisten Fällen war die komplette Leberresektionsfläche mit Netz, Darm und Teilen des Magens verklebt, außerdem waren die einzelnen Leberlappen miteinander verwachsen.

Sheppard et al. (1993) haben in einem Rattenmodell die Ausbildung von Adhäsionen nach Peritonealdefekten untersucht, indem sie die Defekte mit Fibrinkleber oder Nähten verschlossen haben im Vergleich zu einer Kontrolle, bei der der Defekt offen blieb. Sheppard et al. (1993) konnten damit zeigen, dass Fibrinkleber Adhäsionen verhindert und signifikant weniger Adhäsionen ausbildet im Vergleich zur Kontrolle. Diese Aussage deckt sich ebenfalls mit den Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit. Aus anderen Studien (SHEPPARD et al., 1993) ist zudem bekannt, dass Fibrinkleber nach 5-7 Tagen verschwunden ist. Dies ist im Einklang mit unserer Studie, bei der sowohl nach 7 als auch nach 21 Tage keine Fibrinkleberreste gefunden werden konnten. Bei unserem Projekt konnte nach beiden Überlebenszeitpunkten sowohl bei der K1- als auch der Histoacrylgruppe makroskopisch und mikroskopisch Kleberreste gefunden werden, aber nicht bei der Gruppe, bei der Fibrinkleber verwendet wurde.

Demirel et al. (2008) haben mit ihrer Arbeit untersucht, wie Fibrinkleber auf die Leberregeneration wirkt und wie der Gewebekleber eine Rolle bei der Entwicklung von intraabdominalen Adhäsionen spielt. Dafür führte die Arbeitsgruppe eine atypische Leberresektion durch, wie bei der vorliegenden Arbeit, und verglichen die

Ergebnisse nach Verwendung von Fibrinkleber, von Nähten und einer Kontrollgruppe miteinander. Es konnte gezeigt werden, dass bei der Anwendung von Fibrinkleber signifikant weniger Adhäsionen (Fibrinkleber vs. Naht) auftraten und dass in der Nahtgruppe schwere Adhäsionen zwischen der Leber und dem Omentum majus (das große Netz) auftraten. Wie in unserer Studie konnte belegt werden, dass bei der Anwendung von Fibrinkleber die Blutungszeit verkürzt werden kann, dass sich die Leber schneller regeneriert und dass schwächere bzw. weniger Adhäsionen vorzufinden waren.

Bei fast allen Tieren unserer Studie konnte festgestellt werden, dass sich das Omentum majus über die Resektionsfläche gelegt hat. Im Falle von Histoacryl geschah dies bei sehr starken Verwachsungen und ebenfalls sehr adhärent, bei schwächeren Adhäsionen lag das Netz häufig auch nur auf der Resektionsfläche auf; bei stumpfer Lösung (ohne Manipulation) wurde dies nicht als Adhäsion gewertet.

Das Omentum ist eine fett- und bindegewebsreiche Schicht, die vom Peritoneum überzogen ist. Das Netz ist hauptsächlich verantwortlich für die Immunabwehr im Abdomen und beinhaltet Makrophagen und Lymphozyten. Im Falle einer Entzündung wird die Anzahl der Immunzellen vermehrt und es legt sich schützend über die entzündlichen Bereiche. Außerdem spielt das Omentum majus eine Rolle bei der Fettspeicherung und bei der Flüssigkeitsregulation im Peritonealraum (SADLER, 2003). Aufgrund der eben genannten Eigenschaften des Netzes macht man sich diese positiven Eigenschaften zunutze und verwendet es seit Jahren in der Therapie von Wundheilungsstörungen (z.B. Verwendung vom Omentum majus bei der Brustkrebschirurgie, KIRICUTA, 1963).

Diese physiologische Rolle des Netzes erklärt daher, warum bei der vorliegenden Studie in den meisten Fällen das Omentum locker der Resektionsfläche auflag. Wenn sich diese Reaktion verstärkt und in einer immer stärker werdenden inflammatorischen Reaktion resultiert, kommt es zur vermehrten Anreicherung von Entzündungszellen, so dass sich anschließend, wie meist bei der Anwendung von Histoacryl, Adhäsionen ausgebildet haben. Dass sich das Netz also auf die Fläche legt, ist erst einmal positiv zu bewerten. Bei einer zu starken Reaktion und Entzündung kippt die Situation und es bilden sich stärkere Adhäsionen aus, die zu den negativen Nachwirkungen von chirurgischen Eingriffen zählen und somit nicht erwünscht sind.

Zusammenfassend konnten wir also feststellen, dass die Verwendung von Fibrinkleber, wie auch in anderen Studien, die schwächsten Adhäsionen verursacht. Die Tiere, bei denen Histoacryl angewendet wurde, schlossen mit Abstand am schlechtesten ab, und der mit dieser Arbeit zu überprüfende, neue Gewebekleber K1 lag im tolerablen Mittelfeld mit nicht signifikanten unterschiedlichen Ergebnissen im Vergleich zur Fibrinklebergergruppe.

4.1.9. Histologie

4.1.9.1. H.E.-Färbung

Mit Hilfe der H.E.-Färbung wurde die hepatozelluläre Schädigung in der Reaktionszone semiquantitativ ausgewertet, indem verschiedene Parameter analysiert wurden (vgl. Kapitel 2.5.1.). Zudem wurde das Ausmaß der Gewebereaktion bestimmt, indem die Reaktionszone, also das inflammatorische Infiltrat zwischen Lebergewebe und Gewebekleber, vermessen wurde.

Unsere Untersuchung der Reaktionszone lehnt sich an andere Veröffentlichungen in der Literatur an. Tovar et al. (1998) untersuchten z.B. an einem Leberresektionsmodell an der Ratte drei unterschiedliche Behandlungsmethoden und nahmen am Finaltag Histologieproben der Resektionsfläche, um die Effekte der verschiedenen Methoden auf das Modellgewebe mikroskopisch zu untersuchen. Die Arbeitsgruppe nannte die Zone nicht Reaktionszone, sondern „perilesional area“. Die Arbeitsgruppe um Turner et al. (2002) ging ebenso vor: nach 7 bzw. 75 Tagen wurde das resezierte und behandelte Leberareal entnommen und histologisch untersucht.

Die vermessenen Ausmaße (Breite) unserer untersuchten Leberreaktionszonen unterschieden sich sowohl nach 7 als auch nach 21 Tagen nicht signifikant zwischen den drei Klebergeruppen. Dieses Ergebnis wird auch in der Literatur berichtet. Biondes-Simoes et al. (2007) haben ebenfalls mit ihrem Leberresektionsmodell an der Ratte gezeigt, dass es zu keiner signifikanten unterschiedlich großen Wundfläche zwischen der Fibrinkleber- und Histoacrylgruppe gekommen ist.

Auch wenn bei uns kein signifikanter Unterschied zwischen den Klebergeruppen festzustellen war, zeigte sich, wie bei der Beurteilung der intraabdominellen Adhäsionen, dass die Reaktion (Breite der Zone) bei der Anwendung von

Fibrinkleber am niedrigsten war und dass K1 und Histoacryl nicht signifikant höhere Reaktionen auslösten.

Eine breitere Zone kann auf eine stärkere Reaktion zwischen Lebergewebe und Gewebekleber hinweisen. So belegen die Ergebnisse, dass der Fibrinkleber als biologisches Material die niedrigste Reaktion verursachte, gefolgt vom neu entwickelten Kleber K1. Dieses Ergebnis verfehlte jedoch die statistische Signifikanz. Bei der Verwendung des synthetischen Materials (K1) reagierte das Organgewebe etwas heftiger, und Histoacryl löste im Vergleich zu den beiden eben genannten Gruppen eine noch deutlichere (aber nicht signifikant unterschiedliche) Antwort aus.

Um die Rolle der Kleber auf die Qualität dieser Reaktion beurteilen zu können, wurden verschiedene Parameter (vgl. S. 45) in der Reaktionszone semiquantitativ bestimmt, um eine präzisere Aussage über die Anwendung der verwendeten Gewebekleber treffen zu können. Ähnliche Ansätze sind ebenso in der Literatur zu finden. Die Arbeitsgruppen um Tovar et al. (1998) und Demirel et al. (2008) haben Klebertestungen an Leberresektionsmodellen durchgeführt und histologische Auswertungen zur Klebverträglichkeit angebracht, indem verschiedene Parameter wie Nekrose, Blutungen, fibrovaskuläre Strukturen (Bindegewebe mit vaskulären Strukturen), multinukleäre Zellen (z.B. Fremdkörperriesenzellen) und das inflammatorische Exsudat des behandelten, verheilten Resektionsareals analysiert wurden. Dafür wurde ein Scoresystem verwendet, dass in der vorliegenden Arbeit ebenfalls Gebrauch fand. Bei der Auswertung jedes einzelnen Parameters (Zellzahl, Bindegewebe, Blutgefäße, Mononukleäre Zellen, Granulozyten, Fremdkörperriesenzellen, Nekrose, Granulome) wurden für dessen Intensität 0-3 Punkte vergeben (0 = nicht vorhanden, 1 = mild, 2 = moderate, 3 = severe). Jedes Präparat eines Versuchstieres wurde bei 400fachen Vergrößerung in mindestens 5 Zonen (in der Reaktionszone) ausgewertet (vgl. Kapitel 2.5.1.).

Als ersten Parameter haben wir die allgemeine Zellzahl in der Reaktionszone ausgewertet. Hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Klebergruppen oder den verschiedenen Überlebenszeitpunkten auf. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass es zu einer Reduktion der Gesamtanzahl der Zellen im Vergleich der 7 und 21 Tagen innerhalb jeder Klebergruppe gekommen ist, wenn auch nicht signifikant. In der vorangegangenen Literatur wurde der Parameter Zellzahl leider nicht erwähnt, so dass unsere Erkenntnisse nicht verglichen werden können. Dieser Parameter ist dennoch sehr interessant, da eine hohe Zellzahl eine

hohe Reaktion auf den aufgetragenen Kleber bedeuten kann. Die Abnahme des Zellgeschehens im Vergleich der 7 und 21 Tage zeigt, dass sich das Lebergewebe/der Organismus anfangs intensiv mit dem Material auseinander gesetzt hat, und dass die Gewebereaktion nach drei Wochen schwächer geworden ist und abklingt.

Der Parameter Bindegewebe verhielt sich ähnlich wie die Gesamtzellzahl. Hier konnten wir zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede feststellen. Die Tendenz des anwesenden Bindegewebes nahm nach 3 Wochen im Vergleich zur einer Woche ab. Auch Tovar et al. (1998) konnten bei ihrem Leberresektionsprojekt (Naht vs. Koagulation vs. Fibrinkleber) zeigen, dass die Anwesenheit der fibrovaskulären Strukturen mit der Zeit abnimmt, mit keinem signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

So konnten wir zeigen, dass es zu keiner unterschiedlichen Festigkeit und Ausprägung des Narbengewebes zwischen den drei getesteten Gewebeklebern gekommen ist, und dass die Regeneration (hinsichtlich der Zellzahl und des entstehenden Bindegewebes) nach Anwendung der drei Methoden, ähnlich verlief.

Als weiteren Parameter haben wir das Vorkommen von neuen Kapillaren in der Reaktionszone beurteilt. Hier konnten wir zeigen, dass ein signifikanter Unterschied nach 7 Tagen zwischen der K1- und Fibrinklebergergruppe aufgetreten ist. Bei K1 fanden wir die wenigsten Kapillaren. Leider findet sich zu dieser Auswertung keine vergleichende Literatur. Tovar et al. (1998) untersuchten, wie schon oben beschrieben, die fibrovaskulären Strukturen und konnten keine signifikanten Unterschiede feststellen. Es wäre denkbar, dass der biologische Fibrinkleber die Vaskularisierung begünstigt und daher hier höhere Werte aufgefallen sind. Es wurde in der Vergangenheit schon bewiesen, dass die Geweberegeneration nach Anwendung von Fibrinkleber begünstigt wird und schneller abläuft, da der Kleber einer fördernde Rolle in der Wundheilung spielt (KARACSONYI et al., 1986). Dies kann die erhöhte Anzahl an Kapillaren erklären.

Wir haben außerdem das Erscheinen verschiedener Entzündungszellen beurteilt, um einschätzen zu können, welche Entzündungsreaktion durch die Anwendung der verschiedenen Materialien hervorgerufen wurde.

Entzündung ist ein wichtiger Bestandteil des Wundheilungsprozesses (KEYLOCK et al., 2008) und führt zur Ansammlung von polymorphnukleären Zellen und Makrophagen durch inflammatorische Zytokine und Chemokine.

Sowohl beim Parameter mononukleäre Zellen und Granulozyten konnten wir keine signifikanten Unterschiede feststellen. Bei beiden Parametern wurde aber ersichtlich, dass das Ausmaß der Reaktion innerhalb der Zeitspanne (7 und 21 Tage) abnahm. Dieses Phänomen konnte Tovar et al. (1998) ebenfalls belegen.

Biondes-Simoes et al. (2007) haben beim Vergleich zwischen einem neuen Gewebekleber, Fibrinkleber und Histoacryl an einem Leberresektionsmodell gezeigt, dass alle drei Kleber in der histomorphologischen Auswertung eine chronische Entzündung hervorgerufen haben, d.h., dass wie bei unseren Projekt nach 21 Tagen immer noch Entzündungszellen vorhanden sind, wenn auch weniger als nach 7 Tagen. Die Fibrinklebergergruppe zeigte bei Biondes-Simoes et al. (2007) im direkten Vergleich allerdings auch eine bessere und schnellere Leberregeneration als bei Histoacryl. In der vorliegenden Studie konnte ebenso belegt werden, dass es zu einer akuten Entzündungsreaktion nach 7 Tagen und einem chronischem Entzündungsgeschehen bei allen drei Klebergeruppe nach 21 Tagen gekommen ist und dass der Verlauf bei den Fibrinklebertieren insgesamt schwächer verlief (wenn auch nicht signifikant unterschiedlich). So war in allen drei Gruppen eine deutlich ausgebildete Reaktionszone nach beiden Überlebenszeitpunkten der Ratten vorzufinden und eine vermehrte Einwanderung von Entzündungszellen in dieser Zone zu finden. Es konnte in jeder Gewebeklebergergruppe eine sichtbare Immigration von neutrophilen Granulozyten bewertet werden, ohne dass sich die Ergebnisse signifikant unterschieden. Nach 21 Tagen wurden weniger Granulozyten gefunden als nach 7 Tagen; da diese, wie von Lin et al. (1997) beschrieben, vor allem in der akuten Phase der Entzündung zu finden sind. Singh et al. (2008) konnten durch ihr Leberteileresektionsmodell ebenso zeigen, dass nach 7 Tagen eine v. a. akute inflammatorische Antwort basierend auf neutrophilen Granulozyten entsteht und sich die zelluläre Antwort nach 14 Tagen von polymorph zu monozellulär verschiebt.

Des Weiteren haben wir uns für die Auswertung der Parameter Fremdkörperriesenzellen (FKRZ) und Granulome entschieden. Diese Parameter sollten nicht getrennt voneinander betrachtet werden, da sie in einem Zusammenhang stehen. Darauf wird im folgenden Abschnitt noch eingegangen.

Mit unserer Studie konnten wir zeigen, dass es bei allen Klebern zu beiden Zeitpunkten zum Auftreten von FKRZ kam. Nach 7 Tagen war allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ersichtlich. Nach 21 Tagen haben wir die höchste Anzahl in der K1-Gruppe ermittelt, gefolgt von der Histoacrylgruppe.

Somit unterschieden sich die Gruppen K1 und Fibrinkleber hoch signifikant voneinander und die Histoacrylgruppe signifikant von der Fibrinklebergergruppe. Auffällig ist auch, dass nach 7 Tagen bei allen Gruppen weniger FKRZ sichtbar waren als nach 21 Tagen. Es kommt also im Laufe der Zeit zum Anstieg innerhalb der Klebergruppen.

Biondes-Simoes et al. (2007) zeigten ebenfalls mit ihrer Arbeit, dass bei der Verwendung von Histoacryl eine deutlich intensivere Reaktion entsteht als bei der Anwendung von Fibrinkleber, und dass als Zeichen für ein chronisches Geschehen reichlich Fremdkörperriesenzellen nachgewiesen werden konnten. Beim vorliegenden Projekt fand sich ebenfalls die höchste Anzahl an Riesenzenen in der K1- und in der Histoacrylgruppe. Da beide Substanzen synthetisch sind, ist es folglich nachvollziehbar, dass der Organismus versucht das Material abzubauen und es bei Nicht-Gelingen einzukapseln und somit eine Fremdkörperreaktion hervorzurufen, so wie es oben beschrieben wurde.

Zudem wurden nach 7 Tagen kaum bzw. nur vereinzelt Fremdkörperriesenzellen im Probenmaterial gefunden, was sich mit der oben genannten Aussage deckt, dass eine Fremdkörperreaktion typisch für ein chronisches Geschehen ist.

Nach 21 Tagen wurden also die meisten FKRZ bei K1 und Histoacryl gefunden, wobei in der Fibrinklebergergruppe nur sehr vereinzelt ein Verbund von Makrophagen zu finden war. Tovar et al. (1998) konnten auch schon nachweisen, dass drei Wochen nach der Leberteilsresektion und Klebung der Reaktionsfläche mit Fibrin, in dieser Gruppe, im Gegensatz zu den anderen beiden Gruppen (Air coagulation und Naht), keine FKRZ mehr zu finden waren.

Forseth et al. (1992) und Makady et al. (1991) haben ebenfalls Histoacryl verwendet und im Vergleich zu anderen Cyanoacrylaten getestet. Sie konnten zeigen, dass Histoacryl subkutan verwendet, zunächst eine deutliche akute Entzündung hervorruft, ebenso wie eine spätere Fremdkörperreaktion in Form von FKRZ. Die Fremdkörperreaktion von Histoacryl konnte bisher bis zu einem Jahr nach Verwendung belegt werden. Borba et al. (2000) verglichen in ihrer Studie Ethyl-Cyanoacrylat (Super-Bonder) und Butyl-Cyanoacrylat (Histoacryl), indem die Substanzen zum Wundverschluss verwendet wurden. Sie konnten aufzeigen, dass Histoacryl erst ein akutes, mildes Entzündungsgeschehen verursacht, dem anschließend eine milde FKRZ-Reaktion folgt und einen minimalen histotoxischen Effekt auf das Gewebe ausübt.

Die Auswertung des Parameters Granulom deckt sich mit den Aussagen der Zählung der FKRZ. Die beiden Parameter bedingen sich gegenseitig, da man unter einem Granulom die Ansammlung verschiedenster Zelltypen (Entzündungszellen, FKRZ etc.) versteht, die ein Fremdmaterial umgeben und als Reaktion auf infektiöse, allergische Prozesse oder Fremdkörper entstehen.

Sowohl nach 7 als auch nach 21 Tagen konnten die meisten Granulome in der K1-Gruppe gefunden werden, gefolgt von der Histoacryl- und der Fibrinklebergergruppe. So wies die K1-Gruppe eine signifikant höhere Rate an Granulomen im Vergleich zur Histoacrylgruppe auf und nach 21 Tagen eine signifikant höhere Anzahl als die Fibrinklebergergruppe. Diese Aussage korreliert, wie schon oben erwähnt, mit den Ergebnissen der FKRZ und beruht auf der synthetischen Herkunft von K1 und Histoacryl, da der Organismus, in diesem Fall das Leberparenchym, versucht das fremde Material zu degradieren (dient als inflammatorischer Stimulus → Granulozyten, Makrophagen werden angezogen) (KLINGE et al., 2010), was nicht so trivial vonstatten geht, wie der Abbau des Fibrinklebers, der auf biologischen Material basiert. Daher entsteht durch die Verwendung von dem synthetischen Material eine typische Fremdkörperreaktion mit Einkapselung des Biomaterials und der Isolation der Substanz vom umgebenden Gewebe (LIN et al., 1997). *In-vitro* konnte außerdem bereits gezeigt werden, dass die Makrophagen nach Zusammenschluss zur FKRZ ihre biochemischen Eigenschaften (Ausschüttung von bioreaktiven Wirkstoffen zum Abbau des fremden Materials) behalten (SCHLESINGER et al., 1984).

Abschließend kann durch die Ergebnisse vermittelt und belegt werden, dass es durch das Vorhandensein von FKRZ zur Mobilisierung von Fremdmaterial kommt (z.B. Kleberreste), und dass durch diese schwer abbaubaren Materialien im weiteren Verlauf Granulome entstehen. Im Gesamtbild spricht man dann von einer Fremdkörperreaktion, die vor allem bei den synthetischen Gewebeklebern im Rahmen dieser Arbeit aufgetreten ist.

Zusammenfassend kann zur Bewertung der hepatozellulären Schädigung durch die Analyse der verschiedenen Parameter gesagt werden, dass es zu den geringsten Reaktionen beim Einsatz von Fibrinkleber kam, was schon in vielen anderen Studien belegt worden ist, und was vor allem auf den biologischen Herkunft des Materials zurückzuführen ist.

K1 und Histoacryl riefen vor allem im chronischen Verlauf eine stärkere Reaktion hervor, die durch die Anwesenheit von FKRZ und Granulomen gekennzeichnet ist. Da es sich bei beiden Substanzen um synthetische Materiale handelt, ist die Reaktion typisch und die Konsequenz, die aus der Herkunft des Materials resultiert. Der Organismus versuchte das Material mit allen Mitteln abzubauen und reagiert mit einer charakteristischen Fremdkörperreaktion.

Es sollten weitere Versuche mit längeren Überlebenszeitpunkten durchgeführt werden, um den weiteren Verlauf der Reaktion zu beobachten und die hepatische Schädigung noch besser bewerten und eingrenzen zu können.

4.1.9.2. *Sirius Red (Kollagenfärbung)*

Mit Hilfe der Sirius Red Färbung wurde das Kollagen in der Reaktionszone dargestellt, dass sich in das Kollagen Typ I (das festere, spätere Kollagen, rote Färbung) und das Typ III-Kollagen (frühere Kollagen, grüne Färbung) einteilen lässt. Durch die Berechnung des Kollagen I/III – Quotienten lässt sich auf das Verhältnis von Typ I – und Typ III-Kollagen im Regenerationsgewebe schließen. Nur bei einem bestmöglichen Quotienten (hängt von der Art des Gewebes ab) kann eine stabile Narbe entstehen, daher kann ein nicht optimaler Wert z.B. Wundheilungsstörungen verursachen.

Zwischen den drei Klebergruppen ließen sich keine signifikanten Unterschiede beobachten. Biondes-Simoes et al. (2007) haben ebenso wie in der vorliegenden Arbeit einen neuen Gewebekleber im Vergleich zu Fibrinkleber und Histoacryl an einem Leberresektionsmodell getestet und eine Sirius Red Färbung durchgeführt, um den Kollagengehalt der Narbe bestimmen zu können. Auch hier konnten, wie in unserer Studie, keine signifikanten Ergebnisse zwischen den Klebern belegt werden. Beim zeitlichen Verlauf in der Fibrinklebergergruppe ließ sich bei der vorliegenden Arbeit eine höchst signifikante Zunahme des Quotienten feststellen. Die anderen beiden Klebergruppen verhielten sich zu beiden Zeitpunkten ähnlich. Es wäre denkbar, dass sich das Narbengewebe bei der Anwendung von Fibrinkleber, als einzigem biologischem Kleber in dem Projekt, im Verlauf der Zeit anders verhält als bei den synthetischen Klebern und sich daher der Anstieg des Quotienten nach 21 Tagen erklären lässt.

Diesem Sachverhalt konnte im Rahmen dieser Arbeit aber nicht weiter nachgegangen werden und somit nicht abschließend geklärt werden. Dazu wären weitere Auswertungen nötig.

Zudem finden sich zur Sirius Red Färbung am Lebergewebe nur dürftige Literaturangaben. Vielmehr finden sich Angaben zum Quotienten bei der Wundheilung in der Haut (z.B. Meshimplantation, (JAMES, 1990; MARTINEZ-HERNANDEZ et al., 1991; KLINGE et al., 2000+2010; JUNQUEIRA und BRENTANI, 1979)), die nicht direkt mit unserer Auswertung am Lebergewebe verglichen werden können.

4.1.9.3. Immunhistologie

Zur immunhistochemischen Untersuchung der Reaktionszone und des angrenzenden Lebergewebes wurden verschiedene Färbungen mit Antikörpern durchgeführt und der prozentuale Anteil der positiven Zellen ermittelt.

In keiner der vorher erwähnten Veröffentlichungen, die ebenfalls neue Gewebekleber an einem Leberresektionsmodell getestet haben, wurden immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt. Daher können die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht mit diesen Publikationen verglichen werden. Bei den verschiedenen Färbungen werde ich jedoch einige vergleichende Studien nennen, die mit einem anderen Gewebe gearbeitet haben und nicht wie wir mit dem Modellgewebe Leber.

Auch wenn keine Leberresektionsstudie zusätzlich immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt hat, war es uns dennoch wichtig, die Resultate der H.E.-Färbung durch die Analyse verschiedener Antikörperfärbungen zu unterstützen und infolgedessen differenzierter und noch ausführlicher bewerten zu können.

TUNEL- Färbung

TUNEL steht für "Terminale Desoxyribosyl-Transferase mediated d-UTP Nick End Labeling" und erlaubt die Auswertung von apoptotischen Zellen (CLAVIEN et al., 2000).

Es wurden sowohl in der Reaktionszone zwischen Leber und Kleber als auch in der der Reaktionszone angrenzenden Leberzone der Prozentsatz der positiven Zellen, und damit der Anteil apoptotischer Zellen, ermittelt.

Die höchste Apoptoserate in der Reaktions- und Leberzone konnte mit knapp 20% positiven Zellen sowohl nach 7 als auch nach 21 Tagen in der Histoacrylgruppe gefunden werden. Signifikant höhere Raten im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen konnten in der Reaktionszone nach 21 Tagen ermittelt werden.

In der ausgewerteten Leberzone wurden sowohl nach 7 als auch nach 21 Tagen keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gewebeklebergruppen ermittelt.

In keiner der drei Gruppen konnten signifikante An- oder Abstiege zwischen den 2 Zeitpunkten festgestellt werden. Nur innerhalb der K1-Gruppe zeigte sich im Zeitverlauf eine signifikante Verringerung an positiven Zellen im Bereich der Leber.

Bei der Apoptose handelt es sich um einen Vorgang, der notwendigerweise im Organismus vorkommt, daher ist eine gewisse Anzahl an apoptotischen Zellen vertretbar. Im Speziellen ist die Apoptose bei der Leberregeneration nach Leberresektion sogar überlebenswichtig, damit nach Regeneration des Gewebes (nach Wiederaufbau des resezierten Gewebes) die Proliferation von weiterem Lebergewebe gestoppt werden kann und der Organismus damit in der Lage ist „überschießende“ Zellen zu eliminieren (Li et al., 2004). Da der programmierte Zelltod allerdings auch bei pathologischen Ereignissen von entscheidender Bedeutung ist, kann bei den signifikant erhöhten Werten in der Histoacrylgruppe davon ausgegangen werden, dass sich dieser Gewebekleber negativ auf das Lebergewebe und die entstandene Reaktionszone ausgewirkt hat und der Organismus als Schutzfunktion vor dem fremden, nicht gut verträglichen Material den Zelltod vorangeschaltet hat. Zudem gibt die Arbeitsgruppe um Li et al. (2004) an, dass in ischämisch und hypoxisch geschädigtem Lebergewebe eine hohe Summe an Radikalen und Zelltoxinen freigesetzt wird und es dadurch zur vermehrten Zellapoptose kommen kann. Histoacryl setzt bei Anwendung durch die entstehende exotherme Reaktion einen thermischen Schaden im Lebergewebe und führt in Folge zu einer ischämischen Schädigung, die eine signifikant erhöhte Apoptoserate erklären könnte.

K1 und Fibrinkleber weisen nur die physiologisch üblichen Apoptoseraten auf und zeigten in unseren Versuchen keine auffälligen Nebenwirkungen auf das Lebergewebe. Positiv zu bewerten ist auf jeden Fall, dass sich die K1-Werte an denen der Fibrinklebergruppe orientieren und somit gezeigt werden konnte, dass sich die Anwendung des neuen, synthetischen Klebers an den Eigenschaften des biologischen Fibrinklebers anlehnt. Histoacryl schneidet im Vergleich durch den

Parameter „TUNEL-Färbung“ viel schlechter als die beiden anderen Gewebekleber ab.

Ki67- Färbung

Mit Hilfe der Ki67-Färbung wurden all die Zellen angefärbt, die sich gerade im proliferativen Zellzyklus befanden (GERLACH et al., 1997; SCHOLZEN, 2000), daher gilt dieser als Proliferationsmarker. Zellen in der Ruhephase G0 exprimieren das Protein Ki67 nicht und werden demzufolge nicht angefärbt.

Es wurden – ebenso wie bei der TUNEL-Färbung – sowohl in der Reaktionszone als auch in der der Reaktionszone angrenzenden Leberzone der Prozentsatz der positiv proliferativen Zellen ermittelt.

Im Gegensatz zu den TUNEL-Werten, konnten bei der Ki67-Färbung in der Reaktionszone im Mittel höchstens 4% positive Zellen gezählt werden, also ein recht geringer Prozentsatz und dies in allen Gruppen. Nach 7 Tagen fielen keine signifikanten Unterschiede auf, lediglich nach 21 Tagen konnten wir einen signifikanten Unterschied zwischen der K1- und Fibrinklebergergruppe feststellen. Im zeitlichen Verlauf sank der Prozentsatz in der K1-Gruppe signifikant.

Im Bereich der Reaktionszone konnte eine auffallende Erhöhung an Ki67-positiven Zellen nicht nachgewiesen werden, anders als bei der Veröffentlichung von Klinge et al. (2010). Klinge et al. (2010) untersuchten die Gewebeantwort nach Anwendung von Nahtmaterialien und konnten eine hohe Expression von Ki67 positiven Zellen um die Nähte feststellen und außerdem eine Fremdkörperreaktion in der H.E.-Färbung.

Hätten mit dieser Färbung höhere Werte in der Reaktionszone nachgewiesen werden können, hätte dies auf einen deutlichen inflammatorischen Prozess mit vielen aktiven Zellen hingewiesen; dies konnte jedoch nicht belegt werden.

Es ist möglich, dass wir die meisten Ki67-positiven Zellen nach 21 Tagen bei der Anwendung von Fibrinkleber gefunden haben, da Fibrinkleber einen fördernden Charakter im Bezug auf die Wundheilung spielt und somit die Proliferation von Zellen unterstützt (KARACSONYI et al., 1986). Da die prozentualen Anteile, wie oben bereits erwähnt, mit 1,5-5% in einem niedrigen Bereich lagen, fallen die Unterschiede jedoch kaum auf.

Auch wenn andere Autoren, die Klebertestungen am Lebergewebe durchgeführt haben, keine immunhistochemischen Untersuchungen angebracht haben, so haben

wir uns für diesen Faktor entschieden, um eventuelle chronische Proliferationsreize im Resektionsgebiet visualisieren zu können.

In der Tumordiagnostik spielt Ki67 schon seit einiger Zeit eine wichtige Rolle als unabhängiger und signifikant prognostischer Faktor. Bei Prostata- (AALTOMAA et al., 1997) oder Mammakarzinomen (MOLINO et al., 1997) können charakteristische Befunde mit Ki67 verdeutlicht werden.

Auch bei der Analyse von Fremdkörperreaktionen kann die Visualisierung von Ki67 von Bedeutung sein. Die Arbeitsgruppe um Klinge et al. (2010) wies eine enorme Ki67-Aktivität um chirurgische Fasern in der Heilungsphase der Haut nach. Da sich bei unserer Auswertung der H.E.-Färbung bei beiden synthetischen Klebstoffen Fremdkörperreaktionen herauskristallisiert haben, hätte man davon ausgehen können, dass wir ähnliche Ergebnisse wie Klinge et al. (2010) erhalten. Dies hat sich jedoch nicht bestätigt. Die geringen positiven Anteile der Färbung belegen, dass der Proliferationsreiz bei allen Gruppen schwach war. Dies wirkt sich positiv auf die Bewertung der Kleber aus.

In der Leberzone wurde keine erhöhte Proliferation erwartet und auch beobachtet. Dies belegt die Aussage, dass die kompensatorische Hyperplasie bei Ratten schon nach 14 Tagen abgeschlossen ist (HIGGINS und ANDERSON, 1931) und die Regeneration ohnehin im periportalen Bereich beginnt (BAIER et al., 2006) und zu finden wäre.

Des Weiteren konnte bei der vorliegenden Arbeit keine Korrelation zwischen dem Parameter TUNEL und Ki67 gefunden werden.

Cyclooxygenase-2-Färbung (COX-2-Färbung)

Wie COX-1 gehört COX-2 zu den Cyclooxygenasen, die eine wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen spielen. COX-1 wird konstitutiv von einer Mehrzahl von Zellen exprimiert, wo hingegen die Synthese von COX-2 u.a. von Entzündungsprozessen abhängt und als regulatorischer Faktor in der Biosynthese von Prostaglandine, Thromboxanen etc. gilt (EBERHART et al., 1994). COX-2 wird als immunhistochemischer Indikator für die Makrophagenaktivierung verwendet und ist bei Nagetieren ein sicherer Marker für die Expression dieser Cyclooxygenase (GORDON, 2003).

Bei der vorliegenden Arbeit zeigten sich bei der COX-2-Bestimmung, ebenso wie bei der Ki67-Auswertung, nur geringe prozentuale Anteile an positiven Zellen.

Dennoch ist ein Trend zu beobachten: Sowohl in der Reaktions- als auch in der Leberzone konnte nach 7 Tage der höchste Wert in der Histoacrylgruppe bestimmt werden. Aufgrund der hohen Varianz konnte allerdings kein signifikanter Unterschied bestimmt werden. Die Histoacrylgruppe zeigte außerdem eine hoch signifikante Abnahme zwischen dem 7. und 21. postoperativem Tag. Dieser Trend belegt die Annahme, dass es sich in den ersten 7 Tagen um einen akuten inflammatorischen Prozess, mit vielen aktiven Zellen handelt, wobei nach 21 Tagen ein chronisches Geschehen vorliegt und sich somit der Entzündungscharakter verändert hat.

Schürmann et al. (2010) haben die Rolle der Makrophagen bei der Wundheilung in einem Hautlappenmodell an der diabetischen Maus untersucht und herausgefunden, dass es nach 5, 7 und 10 Tagen zu einer starken Induktion von COX-2 bei gestörter Geweberegeneration kommt. Obwohl wir eine solche Reaktion bei den synthetischen Klebern erwartet haben, konnten wir dies letztendlich nicht nachweisen; außer, wie oben beschrieben, bei den Werten der Histoacrylgruppe, die auf eine höhere entzündliche Reaktion als bei den anderen beiden Gruppen hinweisen.

Binnebösel et al. (2008) untersuchten die inflammatorische Aktivität von peritonealen Adhäsionen und bestimmten ebenfalls COX-2 als bedeutsamste Komponente der entzündlichen Zellaktivität, da in verschiedenen Tiermodellen die schnelle Expression von COX-2 als Antwort auf entzündliche Reaktionen oder Gewebeschaden nachgewiesen wird (RODGERS et al., 1997; BINNEBÖSEL et al., 2008). Binnebösel et al. (2008) konnten belegen, dass die COX-2-Expression als Antwort auf einen entzündlichen Stimulus und Gewebeschädigung sehr rasch auftritt, aber auch, dass sich die Expression innerhalb von Wochen auch wieder normalisiert. Diese Aussage trifft auf den Verlauf der Histoacrylgruppe in der Reaktionszone zu. Wir können annehmen, dass K1 und Fibrinkleber eine geringere Reaktion auf das Gewebe ausüben und daher die Werte noch geringer waren als die der Histoacrylgruppe.

In verschiedenen Veröffentlichungen konnte zudem gezeigt werden, dass die Expression von COX-2 im Zusammenhang mit der Bildung von malignen Tumoren steht. So wiesen z.B. Eberhart et al. zum ersten Mal gesteigerte COX-2-Werte in Kolonkarzinomen nach (EBERHART et al., 1994). Außerdem konnte in vielen Studien eine Korrelation zwischen der Überexpression von COX-2 und einer erhöhten Angiogenese, vermehrtem Zellwachstum und einer erniedrigten

Apoptoserate belegt werden (PRUTHI et al., 2003). Dieses Phänomen konnten wir mit unserer Arbeit nicht zeigen.

CD68-Färbung (Makrophagen)

Unter CD68 versteht man ein Transmembranprotein, das hauptsächlich von Makrophagen exprimiert wird und somit einen Entzündungsmarker darstellt (PULFORD et al., 1990). Eine Entzündung ist ein wichtiger Bestandteil des Wundheilungsprozesses (KEYLOCK et al., 2008) und führt zur Ansammlung von polymorphnukleären Zellen und Makrophagen durch inflammatorische Zytokine und Chemokine. Wir haben uns daher entschieden eine CD68-Färbung und Auswertung durchzuführen, da wir uns erhofft haben, etwas über die Ausdehnung der entzündlichen Reaktion nach der Leberresektion und Klebung zu erfahren.

In der Reaktionszone war zu keinem Zeitpunkt zwischen den Klebergruppen ein signifikanter Unterschied ersichtlich. In der Leberregion konnten im Verlauf der 21 Tage eine signifikante Abnahme bei der K1- und Histoacrylgruppe beobachtet werden. Dies deckt die Annahme, dass eine anfängliche Entzündung und Expression von CD68 und Makrophagen nach einiger Zeit abnimmt und die Entzündungsreaktion nachlässt.

Die Arbeitsgruppe um Klinge et al. (2010) konnte mit Hilfe der Expression von CD68 nachweisen, dass es zu einer verringerten Fremdkörperreaktion bei fehlender Aldosteronproduktion um chirurgisches Nahtmaterial im Organismus kommt. So zeigte sich eine signifikant verringerte Granulomgröße um das Nahtmaterial und signifikant weniger Makrophagen (CD68), weniger Proliferation (Ki67) und weniger Apoptose (TUNEL). In einer Veröffentlichung von Binnebösel et al. (2008) konnte außerdem belegt werden, dass es bei peritonealen, andauernden Adhäsionen zu einer inflammatorischen Antwort kommt, gekennzeichnet durch zelluläre Aktivität. CD68 wurde hier als wichtigste Komponente der inflammatorischen Zellaktivität bestimmt und die Expression war bei Adhäsionen, die unter 12 Monaten bestanden, signifikant höher als bei Adhäsionen, die länger als 12 Monate auftraten. Die Arbeitsgruppe hat demnach nachgewiesen, dass Adhäsionen keine areaktiven Verwachsungen sind, sondern dass es sich um dynamische regenerative Strukturen handelt mit einer eindeutigen zellulären und inflammatorischen Zellantwort (v.a. mononukleäre Zellen wie Makrophagen). Im Bezug auf unsere Studie konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass sich eine zellreiche, reaktive Zone zwischen

der Leber und den verwendeten Klebern bildet, und dass nach 7 Tagen vor allem mononukleäre Zellen zu finden sind und die Anzahl nach 21 Tagen abnimmt. Bei der Auswertung der CD68 Expression zeigten sich in der Reaktionszone nach 7 Tagen tendenziell höhere Werte als nach 21 Tagen verglichen mit der Veröffentlichung von Binnebösel et al. (2008). Bei der Auswertung der Leberzone zeigte sich sogar eine signifikante Abnahme der CD68 Zellen. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen der Studie von Winslow et al. (2010). Diese Arbeitsgruppe untersuchte einen neuartigen Knochenkleber auf Basis des Sekretes des Sandburgwurmes und konnte feststellen, dass Makrophagen (CD68) Teil des normalen Heilungsprozesses sind und beim Abbau der Klebers helfen. 2-4 Wochen nach Verwendung des Klebers auf dem Schädelknochen einer Ratte konnte eine CD68-Expression nachgewiesen werden. Bei einem geklebten Frakturmodell am Schädel konnte gezeigt werden, dass nach 4-12 Wochen zwar noch CD68-Aktivität vorhanden ist, aber geringer als nach 2-4 Wochen. Dieses Ergebnis konnten wir in der Reaktionszone bei der vorliegenden Arbeit auch erzielen und nachweisen.

Klinge et al. (1999) haben in einer Untersuchung mit verschiedenen implantierten Meshes (Netz, zur Hernienbehebung in der Humanmedizin) festgestellt, dass die entzündliche Reaktion des Gewebes von der chemischen, physikalischen und mechanischen Komponente des Implantates abhängt und dass die Reaktion um körperfremdes Material für viele Jahre anhält und dass bei einer chronisch-entzündlichen Fremdkörperreaktion um fremdes Material viele Granulome mit Makrophagen (CD68) auftreten. Bei synthetischen Klebern verhält sich die Reaktion ebenso: bei der Verwendung von K1 und Histoacryl konnte in der H.E.- Färbung nach 21 Tagen die meisten Granulome und Fremdkörperriesenzellen gefunden werden. Bei der CD68-Auswertung konnten in der Reaktionszone nach 7 Tagen in allen Gruppen ca. 6-7% positive Zellen gefunden werden, wobei die Anzahl bei allen Klebern nach 21 Tagen auf ca. 3% sank. Das gleiche Bild erkennt man bei der Auswertung der Leberzone. Somit sieht man nach 21 Tagen eine anhaltenden, wenn auch weniger ausgeprägte Reaktion als nach 7 Tagen.

MPO-Färbung

Myeloperoxidase (MPO) ist ein Enzym, das die Hauptkomponente der Granula von neutrophilen Granulozyten darstellt (AMANZADA et al., 2011) und durch Degranulation freigesetzt wird (LENZ et al., 2011). Unter normalen Umständen ist

das Enzym in der Leber nicht aktiv und nicht zu finden, daher ist es ein guter Indikator, um die Anreicherung von neutrophilen Granulozyten und deren Aktivierung zu bestimmen (HELEWSKI et al., 2011).

In der vorliegenden Arbeit konnte in der Reaktionszone zwischen den Klebern und dem Lebergewebe MPO mittels immunohistochemischer Färbung nachgewiesen werden, wenn auch in sehr geringem Maße. Dabei unterschieden sich die drei Klebergruppen nicht signifikant voneinander. Dieses Ergebnis zeigt, dass es zu einer geringen inflammatorischen Reaktion seitens des Gewebes auf die Kleber kam, die Antwort jedoch sehr gering war und die Leber somit nicht negativ beeinflusst hat. Im Gegenteil, inflammatorische Reaktionen (SÖZEN et al., 2011) und das Einwandern von entzündlichen Zellen sind ein wichtiger Bestandteil des Heilungsprozesses (KEYLOCK et al., 2008) und in einem gewissen Masse physiologisch nötig und unbedenklich.

4.2. Schlussbetrachtung

Mit dieser Arbeit wurde ein neu entwickelter, vollsynthetischer Gewebekleber (K1) auf Basis von Polyurethan hinsichtlich seiner Biokompatibilität und Biofunktionalität überprüft.

In vorangegangenen Untersuchungen der Firma Bayer MaterialScience AG konnte erfolgreich gezeigt werden, dass der neue Kleber bioverträglich ist (*in-vitro* Testung gemäß ISO 10993) und keine mutagene oder reizende Wirkungen zeigt und die Wundheilung nicht negativ beeinflusst wird. In den *in-vitro* Untersuchungen konnte zudem dargestellt werden, dass an der Wundheilung beteiligte Zellen, wie Keratinozyten-, Fibroblasten und Melanozyten den synthetischen Kleber nicht meiden, sondern an ihm entlang wachsen. Somit kann der Gewebekleber als biokompatibel eingestuft werden.

Aufgrund dieser Aussage wurde mit der hier vorliegenden Arbeit erstmals eine *in-vivo* Testung des Materials durchgeführt. Zusätzlich sollte die „non-inferiority“ zum klinischen Standard gezeigt werden, daher wurde Fibrinkleber und Histoacryl im Vergleich getestet.

Die Kleber wurden an einem Leberresektionsmodell an der Ratte hinsichtlich ihrer Handhabung, Hämostasefähigkeit, Adhäsionsverhalten und histologischen Gewebeverträglichkeit überprüft. Der neue Gewebekleber K1 konnte in diesem

Tiermodell schnell und sicher eingesetzt werden. Vorteilhaft gegenüber dem Fibrinkleber erscheint das direkte Einsetzen des Applikators ohne vorherige, zusätzliche Vorbereitungen und die Lagerung bei Raumtemperatur. Alle verwendeten Materialien zeigten keinen Einfluss auf die untersuchten Laborparameter. K1 zeigte eine hervorragende Hämostaseeigenschaft, auch wenn die Blutstillung im Vergleich zu den anderen beiden Klebern am langsamsten eintrat. Dies erscheint im ersten Augenblick als Kritikpunkt, allerdings unterschied sich die Blutungszeit von K1 nicht signifikant von der Fibrinklebergruppe („non-inferiority“ im Vergleich zum kommerziellen Fibrinkleber ist somit gezeigt worden), außerdem schadet die kurze Blutungszeit beim Histoacryl dem Gewebe, bedingt durch die Hitzefreisetzung bei der schnellen Polymerisation des Materials. So darf also eine kurze Blutungszeit nicht direkt mit einer positiven Eigenschaft gleichgesetzt werden.

Das Adhäsionsverhalten von K1 ist durchaus als gut zu bewerten, wenn auch geringfügig – aber nicht signifikant von einander abweichend – schlechter als bei der Gruppe, bei der Fibrinkleber verwendet wurde. Auch hier konnte somit die non-inferiority gegenüber dem klinischen Standard bewiesen werden.

Bei der histologischen Bewertung schloss der Fibrinkleber, als biologischer Kleber, am besten ab. Dennoch kann K1 bei der Überprüfung der Gewebeverträglichkeit nicht viel schlechter bewertet werden. Da es sich sowohl bei K1 als auch bei Histoacryl um synthetische Kleber handelt, ist eine entstehende Fremdkörperreaktion durchaus eine physiologische und logische Schlussfolgerung. Dies erklärt, warum die meisten Granulome und Fremdkörperriesenzellen bei diesen Materialien gefunden wurden. Weitere Testungen mit längeren Überlebenszeiträumen wären hier sinnvoll, um den weiteren Verlauf der Gewebeverträglichkeit beurteilen zu können.

Bei der Bewertung der immunhistochemischen Färbungen zeigte Histoacryl bei der Auswertung der apoptotischen Zellen und des Entzündungsmarkers COX-2 das schlechteste Abschneiden, somit kann zusammenfassend gesagt werden, dass K1 und Fibrinkleber am besten abschlossen. Auch hier ist die non-inferiority des neuen Klebers K1 gegenüber dem klinischen Standard Fibrinkleber gezeigt worden.

Zusammenfassend konnte der neu entwickelte, vollsynthetische Gewebekleber K1 gemäß Medizinproduktegesetz als biokompatibel und biologisch sicher eingestuft werden, und es konnte die „non-inferiority“ im Vergleich zur klinischen Standardsituation nachgewiesen werden.

Damit ist die biologische Sicherheit des neuen Kleber *in-vitro* und *in-vivo* gezeigt worden.

4.3. Ausblick

Die *in-vivo* –Tests der vorliegenden Arbeit waren die ersten durchgeführten Versuche des Klebers an einem lebenden Organismus. In weiterführenden Untersuchungen wurde in der Zwischenzeit ein Teil 2 und Teil 3 mit K1 durchgeführt. Hier wurde ein größerer Teil der Leber reseziert (hier: im Durchschnitt 0,274 g Leber, Part 2: 2,947 g Leber), um zu überprüfen, ob K1 mit seiner Hämostasefähigkeit auch bei größeren blutenden Flächen überzeugen kann. Auch hier schnitt der neue Kleber im Vergleich zum Fibrinkleber gut ab. Die Überlebensrate der Ratten lag trotz der großen Resektionsfläche bei 95%. Zudem wird aktuell in einem dritten Teil die Abbaubarkeit von K1 in Langzeitversuchen (z.B. mittels Mikro-CT, 90 Tage) untersucht. Die Firma Bayer MaterialScience AG hat K1 außerdem weiterentwickelt und durch Umstellung einiger chemischer Komponenten zwei weitere Kleber (K2 und K3) entwickelt, die innerhalb von 2 Wochen abbaubar sein sollen.

Erst nachdem eine erfolgreiche Biokompatibilitätsprüfung und biologische Sicherheitsprüfung im Tiermodell durchgeführt wurde, darf ein neues Medizinprodukt anhand einer klinischen Prüfung am Menschen erprobt werden.

Mit der vorliegenden Arbeit wurden die ersten Schritte auf dem Weg zum klinischen Einsatz des neuen Gewebeklebers erfolgreich durchgeführt.

5. Zusammenfassung

Mit Hilfe der vorliegenden Arbeit wurde ein neu entwickelter, vollsynthetischer Gewebekleber auf Polyurethanbasis der Firma Bayer MaterialScience AG hinsichtlich seiner Biokompatibilität und Biofunktionalität überprüft. Dazu führte die Firma Bayer MaterialScience AG eine biologische Verträglichkeitsprüfung (DIN EN ISO 10993) durch, anschließend konnten mit dieser Arbeit die ersten *in-vivo* Versuche des neuen Klebers anhand einer tierexperimentellen Studie an einem Leberresektionsmodell an der Ratte realisiert werden, um gemäß Medizinproduktegesetz eine biologische Sicherheitsprüfung durchzuführen. Zusätzlich wurde die „non-inferiority“ im Vergleich zum klinischen Standard (Fibrinkleber und Histoacryl) beurteilt.

Die biologische Verträglichkeitsprüfung an Keratinozyten, Fibroblasten und Melanozyten ergab, dass vom Kleber keine mutagene oder reizende Wirkungen ausgehen und dass die Wundheilung nicht negativ beeinflusst wird. Die Zellen wandern in der Zellkultur sogar am Kleber entlang.

An einem Leberresektionsmodell an der Ratte wurden das Hämostase- und Klebverhalten und die Gewebeverträglichkeit des neuen Klebers im Vergleich zu den anderen beiden verwendeten Klebern getestet. Dazu wurden 36 männliche Wistarratten randomisiert in drei Versuchsgruppen aufgeteilt mit jeweils zwei unterschiedlichen Überlebenszeitpunkten (7 und 21 Tagen). Nach Durchführung einer Laparotomie wurde jedem Tier ein ungefähr gleichschweres Stück des linken Leberlappens mit einer geraden Schere entfernt. Die blutende Resektionsfläche wurde mit K1, Fibrinkleber oder Histoacryl behandelt; die Blutungszeit- und -menge wurden bestimmt. Außerdem wurden Blutwerte (kleines Blutbild, Leberenzyme AST und ALT, aPTT) am OP- und Finaltag gemessen. Nach Erreichen des Überlebenszeitpunktes wurden die Tiere geopfert, erneute Blutproben entnommen und die intraabdominale Adhäsion makroskopisch mit Hilfe eines semiquantitativen Scores eingeteilt. Die Leber wurde anschließend entnommen und histopathologisch untersucht (H.E.-Färbung, Sirius Red-Färbung, Immunhistologie).

Alle Tiere überlebten den Eingriff und nahmen entsprechend ihrem Alter an Gewicht zu. Die Blutungszeit war bei den Tieren, die mit K1 behandelt wurden, am längsten, unterschied sich jedoch nicht signifikant von der Zeit der Fibrinklebergruppe. Histoacryl zeigte die kürzeste Blutungszeit und somit auch den geringsten Blutverlust. Der Blutverlust zwischen den drei verwendeten Klebergruppen war nicht signifikant.

unterschiedlich. Tendenziell verlor die K1-Gruppe jedoch am meisten Blut. Sowohl K1 als auch der Fibrinkleber brauchen im Gegensatz zum Histoacryl ein wenig mehr Zeit um effektiv zu wirken und auszuhärten. Die Blutuntersuchungen ergaben, dass keiner der drei Kleber einen konkreten Effekt auf den Organismus der Tiere hatte, somit ist die Prüfung auf Hämatokompatibilität (nach DIN EN ISO 10993-4) positiv ausgefallen. In der histologischen Evaluierung zeigte die Anwendung von Fibrinkleber die besten Resultate. K1 und Histoacryl zeigten eine deutliche Fremdkörperreaktion, was auf den synthetischen Hintergrund der beiden Materialien zurückzuführen ist. Fremdkörperreaktionen sind physiologische und notwendige Reaktionen des Organismus auf fremdes Material. Weitere Untersuchungen sind nötig, um zu klären, wie sich die Reaktion bei einem längeren Untersuchungszeitraum verhält.

Histoacryl scheint in der immunhistochemischen Auswertung einen negativen Einfluss auf die Zellen zu haben, so ergaben sich hier die meisten apoptotischen Zellen und die höchste Anzahl an positiven Entzündungszellen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass K1 als biokompatibel und biologisch sicher eingestuft werden kann, außerdem konnte die „non-inferiority“ im Vergleich zum Fibrinkleber mit dieser Arbeit nachgewiesen werden.

Damit ist die biologische Sicherheit des neuen Gewebeklebers *in-vitro* und *in-vivo* gezeigt worden.

6. Summary

***in-vivo* evaluation of a new synthetic adhesive: a liver resection model in rats**

In the present study a newly synthetic adhesive material named K1 (based on polyurethane) developed by Bayer MaterialScience AG was tested regarding its biocompatibility and efficacy.

Bayer performed a biocompatibility test according to DIN EN ISO 10993 at an early stage. Afterwards, the first *in-vivo* experiments were realized using a liver resection model in rats. The aim was to demonstrate biological safety in compliance with the Medical Device Directive. In addition, the non-inferiority of this product was assessed in comparison to the clinical standard materials (fibrin glue and Histoacryl).

The biocompatibility test performed by Bayer, was done using keratinocytes, fibroblasts and melanocytes and showed that the new adhesive does not have a mutagenic or irritant effect, and revealed that wound healing was not adversely affected. The cells in cell culture even migrated along the adhesive.

With the help of the animal study, we compared the hemostasis and the bonding characteristics as well as tissue compatibility of the new glue to fibrin glue and Histoacryl.

For this purpose, 36 male Wistar rats were randomly divided into three groups, each with two different survival periods (7 and 21 days). After laparotomy, an equal piece was removed from the left liver lobe of each animal with a straight scissors. K1, fibrin glue or Histoacryl was applied to the resection surfaces and the bleeding time and lost blood volume were measured. Furthermore, blood parameters were determined on time of surgery and at the end of experimental period.

At the end of the experimental time, rats were sacrificed and blood samples were taken again and the intraabdominal adhesion was determined using a semi-quantitative score. The liver was removed and examined histopathologically (H.E., sirius red staining and immunochemistry).

All animals survived the surgery and showed an increase on body weight consistent with their age. There was no significant difference of bleeding time between the K1 and the fibrin glue groups. The Histoacryl group showed the shortest time and therefore the most low lost blood volume. The blood loss was not significantly different in respect to the three groups.

K1 and fibrin glue needed more time to act effectively and cure in contrast to Histoacryl.

Analysis of blood samples showed that none of the three adhesives had a concrete side effect on animal health. Consequently, the test of hemocompatibility (DIN EN ISO 10993-4) was deemed positive. The lowest degrees of adhesions between the organs were seen in fibrin glue group, followed by the K1-group. Highest formation was observed in the Histoacryl group.

The histological evaluation showed that fibrin glue had the best results. K1 and Histoacryl application let to distinct foreign body reaction due to the synthetic material component of these two adhesives. Further studies are needed to evaluate the nature of this response during a prolonged period of investigation.

Immunohistochemical analysis revealed that Histoacryl exerted a detrimental effect on the cells since in this group, the highest number of apoptotic cells and inflammatory cells were detected.

We could conclude that K1 can be considered as biocompatible and biological safe. It's non-inferiority was demonstrated in comparison to fibrin glue and Histoacryl. This study has shown the biological safety of the new developed polyurethane based tissue glue.

7. Literaturverzeichnis

Abel, BF (1996).

"Wundversorgung", Vorlesungskonzept.

www.bernd-abel.info/Vorlesungen/Wundversorgung.pdf.

Alam HB, Chen Z, Jaskille A, Querol RILC, Koustova E, Inocencio R, Conran R, Seufert A, Ariaban N, Toruno K, Rhee P (2004).

Application of a zeolite hemostatic agent achieves 100% survival in a lethal model of complex groin injury in swine.

J Trauma, 56: 974-983.

Alam HB, Uy GB, Miller D, Koustova E, Hancock T, Inocencio R, Anderson D, Llorente O, Rhee P (2003).

Comparative analysis of hemostatic agents in a swine model of lethal groin injury.

J Trauma, 54:1077-1082.

Aaltomaa S, Lipponen P, Vesalainen S, Ala-Opas M, Eskelinen M, Syrjänen K (1997).

Value of Ki-67 immunolabelling as a prognostic factor in prostate cancer.

European Urology, 32: 410 415.

Amanzada A, Malik IA, Nischwitz M, Sultan S, Naz N, Ramadori G (2011).

Myeloperoxidase and elastase are only expressed by neutrophils in normal and in inflamed liver.

Histochem Cell Biol, 135: 305-315.

Arnaud F, Tomori T, Saito R, McKeague A, Prusaczyk WK, McCarron RM (2007).

Comparative efficacy of granular and bagged formulations of the hemostatic agent QuickClot.

J Trauma, 63: 775-782.

Asmussen PD, Söllner B (2000).

Wundmanagement, Band 2 der „Wundversorgung“.

Hippokrates. 8ff

Baier PK, Baumgartner U, Wolff-Vorbeck G, Hempel S, Hopt UT (2006).

Hepatocyte proliferation and apoptosis in rat liver after liver injury.

Hepatogastroenterology. 53(71): 747-752.

Batista CAM, Neto RC, Filho GdJL (2008).

Comparative study of the healing process of the aponeurosis of the anterior abdominal wall of rats after wound closure using 3-0 nylon suture and N-butyl-2-cyanoacrylate tissue adhesive.

Acta Cirurgica Brasileira - Vol. 23(4).

Bergel S (1909).

Über Wirkungen des Fibrins.

Dtsch Med Wochenschr, 35: 663-665.

Berrevoet F, de Hemptinne B (2007).

Use of tropical hemostatic agents during liver resection.
Dig Surg; 24: 288-293.

Binnebösel M, Rosch R, Junge K, Lynen-Jansen P, Schumpelick V, Klinge U (2008).

Macrophage and T-lymphocyte infiltrates in human peritoneal adhesions indicate a chronic inflammatory disease.
World J Surg, 32: 296-304.

Biondo-Simoes M, Petrauskas R, Dobrowolski AG, Godoy G, Kaiber F, Ossamui Oshii S (2007).

Validity of microporous polysaccharide hemispheres as hemostatic agent in hepatic injuries: an experimental study in rats.
Acta Cirurgica Brasileira - Vol 22 (Supplement 1).

Boehm O, Zur B, Tran N, Freyenhagen R, Hartmann M, Zacharowski K (2007).

Clinical chemistry reference database for Wistar rats and C57/BL6 mice.
Biol. Chem., 388(5): 547-554.

Bonchek LI, Braunwald NS (1967).

Experimental evaluation of a cross-linked gelatin adhesive in gastrointestinal Surgery.
Annals of Surgery, 165(3): 420-424.

Borba CC, Roubaud Neto E, Val RLR, Borba Jr CO, Soufen MA, Francisco Neto A, Sakotani AY (2000).

Use of cyanoacrylate as surgical adhesive in rats skin incisions: experimental study.
Acta Cir Bras., 15: 48-54.

Bosch P, Braun F., Eschberger J (1977).

Die Beeinflussung der Knochenheilung durch hochkonzentriertes Fibrin.
Experimentelle Untersuchung am Kaninchen.
Arch. Orthop. Unfall. Chir., 89: 259-273.

Bothin CG, Okada M, Midtvedt T (1999).

Postsurgical adhesion formation in germfree and ex-germfree rats - a study using three scoring scales.
J Invest Surg, 12: 147-150.

Brieler HS, Birker T, Elfeld H, Seifert J (1986).

Die Effizienz unterschiedlicher Methoden bei der Blutstillung an Milz- und Leberverletzungen - Ergebnisse einer tierexperimentellen Studie.
Z. Esp. Chir. Transplant Kuenstliche Organe, 19: 94.

Bucher NLR (1991).

Liver regeneration: an overview.
J Gastro and Hep, 6: 615-624.

Bucknall TE (1981).

Abdominal wound closure: choice of suture.
J R Soc Med, 74(8): 580-5.

Bürger Th, Fahlke J, Tautenhahn J, Halloul Z (2000).

Erste Erfahrungen mit einem neuen synthetischen Kleber (CoSeal).
Caduceus tyco Healthcare News, 41.

Canonico S (2003).

The use of human fibrin glue in the surgical operations.
Acta Bio Medica, 74; Suppl. 2: 21-25.

Carbon RT (2001).

Gewebeklebung in der Chirurgie.
Thieme Verlag, Hrsg Ringe B, S.1ff.

Caton-Richards M (2011).

Closure of minor wounds with tissue adhesive.
Emergency Nurse, 18(9): 18-20.

Chapman W.C., Clavien P-A, Fung J., Khanna A., Bonham A. (2000)

Effective control of hepatic bleeding with a novel collagen-based composite combined with autologous plasma
Arch. Surg. 2000; 135: 1200-1204

Clavien PA, Sindram D, Bentley RC (2000).

Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans.
Ann Surg, 232: 155-162.

Coover HW, Joyner FB, Shearer NH, Wicker TH (1959).

Chemistry and performance of cyanoacrylate adhesives.
SPE Journal: the official publ. of the Society of Plastics Engineers, 15: 413-417.

Cronkite EP, Lozner EL, Deaver JM (1944).

Use of thrombin and fibrinogen in skin grafting.
JAMA, 124: 976-978.

Davidson BR, Burnett S, Javed MS, Seifalian A, Morre D, Doctor N (2000).

Experimental study of a novel fibrin sealant for achieving haemostasis following partial hepatectomy.
British J of Surg, 87: 790-795.

De Ritis F, Coltorti G, Giusti G (1957).

An enzymic test for the diagnosis of viral hepatitis: The transaminase serum activities.
Clinica Chimica Acta., 2(1): 70-74.

De Wilde RL, Trew G (2007).

Postoperative abdominal adhesions and their prevention in gynaecological surgery.
Expert consensus positions. Part 2 - steps to reduce adhesions.
Expert consensus pos Gynescol Surg 4(4): 243-253.

Demirel AH, Basar OT, Ongoren AU, Bayram E, Kiskurek M (2008).

Effects of primary suture and fibrin selant on hemostasis and liver regeneration in an experimental liver injury.

World J Gastroenterol, 14 (1): 81-84.

Dilege E, Deveci U, Erbil Y, Dinccag A, Seven R, Ozarmagan S, Mercan S, Barbaros U (2010).

N-butyl cyanoacrylate versus conventional suturing for fixation of meshes in an incisional hernia model.

J Invest Surg, 23(5):262-266.

DIN EN ISO 10993

Donkerwolcke M, Burny F, Muster D (1998).

Tissues and bone adhesives – historical aspects.

Biomaterials, 19:1461-1466.

Dräger H und Gill W (1990).

Instrumentenkunde.

Thieme Verlag, 1-9.

Druckrey-Fiskaaen KT, Janssen MWW, Omid L, Polze N, Kaisers U, Nur I, Goldberg E, Bokel G, Hauss J, Schön MR (2007).

Laparoscopic spray application of fibrin sealant effects on hemodynamics and spray efficiency at various application pressures and distances.

Surg Endosc, 21: 1750-1759.

Duffy DM (1996).

Adhesion controversies: pelvic pain as a cause of adhesions.

J Reprod Med., 41: 19-26.

Duncan IC, Gebka M, Hellig F, Cilliers A, Klug E, Harrisberg JR, Govendrageloo K, Middlemost SJ (2004).

Percutaneous endovascular occlusion of symptomatic coronary arteriovenous fistulas with cyanoacrylate.

J Invasive Cardiol, 16(9): 469-474.

Eberhard-Metzger C (1996).

Die Naht aus der Tube.

aus Sonderdruck aus Heft 10/96 aus bild der wissenschaft, Deutsche Verlags Anstalt GmbH, 1996

Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN (1994).

Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas.

Gastroenterology, 107(4): 1183-8.

Ellis H (1980).

Internal Overhealing: The Problem of Intraperitoneal Adhesions.

World J Surg., 4:303-306.

Falb RD und Cooper CW (1966).

Adhesives in surgery,
New Scientist. 308-309.

Fischl RA (1962).

An Adhesive for primary closure of skin incisions.
Plast Reconstr Surg Transplant Bull, 30 (5): 607-610.

Forseth M, O'Grady K, Toriumi DM (1992).

The Current Status of Cyanoacrylate and Fibrin Tissue Adhesives
J Long Term Eff Med Implants, 2: 221-233.

Fotiadis C, Leventis I, Adamis S, Gorgoulis V, Dormeyer P, Zografos G, Sechas M, Skalkeas G (2005).

The use of isobutylcyanoacrylate as a tissue adhesive in abdominal surgery.
Acta Chir Belg., 105(4): 392-396.

Friedman DW, Boyd C, Mackenzie JW, Norton P, Olson RM, Beak SB (1993).

Regulation of collagen gene expression in keloids and hypertrophic scars.
J Surg Res, 55: 214.

Gardezi SAR, Chaudhry AM, Sial GAK, Ahmad I, Yousuf A, Rashid M, Siddique S, Gardezi AJR (1985).

Sutureless skin closure: a comparative study with conventional stitching.
J Pak Med Assoc, 35 (111): 323-326.

Gavrieli, Y., Y. Sherman, S. Ben-Sasson (1992).

Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation.
J Cell Biol, 119 (3): 493-501.

Gerlach C, Scholzen T, Daßler R, Alison MR, Gerdes J (1997).

Ki67 expression during rat liver regeneration after partial hepatectomy.
Hepatology, 26: 573-578.

Giebel G, Rimpler M, Borchers L (1981).

Klebungen am Skelettsystem: Untersuchung der Klebfestigkeit von 22 Klebstoffen am Knochen (Teil 2).
Biomed Tech (Berl), 26(7-8): 170-174.

Gordon S (2003).

Alternative activation of macrophages.
Nat Rev Immunol, 3: 23-35.

Grey EG (1915).

Fibrin as a haemostatic in cerebral surgery.
Surg. Gynecol. Obstet., 21: 452.

Harris PJ, Tebbi JC (1986).

Synthetic adhesives for surgery.
Adhesion/ 10; Chapter 1, Synthetic Adhesives for Surgery, 1-6.

Harvey SC (1916).

The use of fibrin paper and forms in surgery.
Boston Med Surg J, 174: 658-659.

Harvey SC (1918).

Fibrin paper as an hemostatic agent.
Ann. Surg., 68 (1): 66-70.

Heeger EF (1910).

Zur Geschichte der Blutstillung im Altertum.
Wien klin Wochenschr. 1006ff.

Heisterkamp ChA, Simmons RL, Vernick J, Matsumoto T (1970).

Solid organ injuries in vietnam: emergency hemostasis with n-butyl cyanoacrylate adhesive.
AMA Arch Surg, 100: 109-112.

Helewski K, Kowalczyk-Ziomek G, Czecior E, Wyrobiec G, Harabin-Slowinska M, Juszko-Piekut M, Braczowska B, Josko J (2011).

Protective effect of intermittent clamping of the portal triad in the rat liver on liver ischemia-reperfusion injury.
Hepat Mon, 11 (6): 445-451.

Higgins GM, Anderson RM (1931).

Experimental pathology of the liver. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal.
Arch. Path., 12: 186-202.

Hirschelmann A, Tchartchian G, Wallwiener M, Hackethal A, de Wilde RL (2011).

A review of the problematic adhesion prophylaxis in gynaecological surgery.
Arch Gynecol Obstet. 285(4):1089-97.

Huppelsberg J, Walter K (2009).

Kurzlehrbuch Physiologie. Kapitel 2: Blut und Immunsystem.
3. Auflage, Thieme Verlag, S. 23ff.

Jakob H, Campell CD, Stemberger A, Wriedt-Lübbe I, Blümel G, Replogle R (1984).

Combined application of heterologous collagen and fibrin sealant for liver injuries.
J Surg Res, 36: 571-577.

James J (1990).

Sirius red histophotometry and spectrophotometry of sections in the assessment of the collagen content of liver tissue and its application in growing rat liver.
Liver, 10(1):1-5.

Jallali N, Haji A, Watson CJ (2004).

A prospective randomized trial comparing 2-octyl cyanoacrylate to conventional suturing in closure of laparoscopic cholecystectomy incisions.
J Laparoendosc Adv Surg Tech A, 14(4): 209-211.

Jelkmann W (2005).

Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie.

29. Auflage, Springer Verlag, Hrsg Schmidt RF, Lang F, Thews G, S.525ff.

Junquiera LC, Brentani RR (1979).

A simple and sensitive method for the quantitative estimation of collagen.

Anal Biochem, 94(1): 96-9.

Kalayci MU, Soylu A, Eroglu HE, Kubilay D, Sancak B, Ugurluoglu C, Ercin U, Koca Y, Karatepe O (2010).

Effect of ankaferd blood stopper on hemostasis and histopathological score in experimental liver injury.

Bratisl Lek Listy, 111 (4): 183-188.

Karacsonyi S, Farkas G, Karacsonyi H, Bajusz H, Olah T (1986).

Survey of liver regeneration following liver resection by application of fibrin sealant.

In: Schlag G, Redl H, eds. General surgery and abdominal surgery.

Springer Verlag, 1986: 85-90.

Kessler B, Zimmermann RE (1981).

Gewebekleber unter besonderer Berücksichtigung der Fibrinklebung.

Langenbecks Arch Chir 355 (Kongressbericht 1981), SpringerVerlag.

Keylock KT, Vieira VJ, Wallig MA, DiPietro LA, Schrementi M, Wood JA (2008).

Exercise accelerates cutaneous wound healing and decreases wound inflammation in aged mice.

Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 294: R179-R184.

Kiricuta I (1963).

The use of the great omentum in the surgery of breast cancer.

Presse Med 71: 15-7.

Klinge U, Klosterhalfen B, Müller M, Schumpelick V (1999).

Foreign body reaction to meshes used for the repair of adominal wall hernias.

Eur J Surg, 165: 665-673.

Klinge U, Si ZY, Zheng H, Schumpelick V, Bhardwaj RS, Klosterhalfen B (2000).

Abnormal collagen I to III distribution in the skin of patients with incisional hernia.

Eur Surg Res 32: 43-48.

Klinge U, Theuer S, Krott E, Fiebeler A (2010).

Absence of circulating aldosterone attenuates foreign body reaction around surgical sutures.

Langenbecks Arch Surg 395: 429-435.

Koehnlein HE, Lemperle G (1969).

Experimental studies with a new gelatin-resorcin-formaldehyde glue.

Surgery, 66(2): 377-382.

Koehnlein HE, Mergard U (1972).

Experimentelle Testung lokaler Hämostyptika.

Chir. 43: 378.

Lange S, Bender R, Ziegler A (2007).

Äquivalenzstudien und Nicht-Unterlegenheitsstudien - Equivalence and non-inferiority trials.

Dtsch Med Wochenschr, Georg Thieme Verlag Stuttgart - New York, 132:e53-e56.

Lenz AM, Fairweather M, Peyton JC, Gardner SA, Cheadle WG (2011).

Liver injury and abscess formation in secondary murine peritonitis.

Inflamm. Res., 60: 337-345.

Lellé RJ (2000).

Kleben statt Nähen«: Erfahrungen mit dem Gewebekleber Octylcyanoacrylat, gyn (5) 2000, S. 141-146.

Lerner R, Binur NS (1990).

Current status of surgical adhesives.

Journal of Surgical Research, 48: 165-181.

Li Z, Hu DY, Chu Q, Wu JH, Gao C, Zhang YQ, Huang YR (2004).

Cell apoptosis and regeneration of hepatocellular carcinoma after transarterial chemoembolization.

World J Gastroenterol, 10 (13): 1876-1880.

Lin PH, Hirko MK, von Fraunhofer JA, Greisler HP (1997).

Wound healing and inflammatory response to biomaterials.

Chapter 2 aus Wound closure biomaterials and devices, Boca Raton u.a., 7-24.

Luxembourg B, Krause M, Lindhoff-Last E (2007).

Basiswissen Gerinnungslabor.

Dtsch. Ärzteblatt, 104: C1260.

Mahajna A, Hirsh M, Krausz MM (2007).

Use of the hemostatic agent QuikClot for the treatment of massive splenic injury in a rat model.

Eur Surg Res, 39: 251-257.

Makady FM, Whitmore HL, Nelson DR, Simon J (1991).

Effect of tissue adhesives and suture patterns on experimentally induced test lacerations in lactating dairy cattle.

J Am Vet Med Assoc., 198(1): 1932-1934.

Markus PM, König S, Liersch T, Becker H (2000).

Die Leberregeneration.

Der Onkologe, Illiger/ Flentje/ Becker (Hrsg), Springer Verlag, 6: 348-355.

Martinez-Hernandez A, Delgado FM, Amenta PS (1991).

The extracellular matrix in hepatic regeneration. Localization of collagentypes I, III, IV, laminin, and fibronectin.

Lab Invest, 64(2):157-166.

Martinowitz U, Spotnitz WD (1997).

Fibrin tissue adhesives.

Thromb. Haemostasis, 78: 661-666.

Matras H, Dinges HP, Monoli B (1972).

Zur nahtlosen interfarszikularen Nerventransplantation im Tierexperiment.

Wien. Med. Wochenschr., 122: 517-523.

Matsumoto T (1968).

Vienne International Symposium – Tissue Adhesive.

AMA Arch Surg, 96: 226-230.

Matsumoto T, Hardaway RM, Heisterkamp ChA, Pani KC, Leonard F, Margetis PT (1967).

Cyanoacrylate adhesive and hemostasis.

AMA Arch Surg, 94: 858-860.

Medizinproduktegesetz (MPG), Medizinprodukteverordnung (MPV)

Mighelia A, Schiffer D (1995).

Ultrastructural detection of DANN strand breaks in apoptotic neural cells by in situ end-labelling techniques." J Pathol 176: 27-35.

Min SO, Kim SH, Lee SW, Cho JA, Kim KS (2011).

The effect of preconditioning on liver regeneration after hepatic resection in cirrhotic rats.

The Korean Journal of Hepatology, 17:139-147.

Molino, A., r. Micciolo, M. Turazza, F. Bonetti, Q. Piubello, A. Bonetti, R. Nortilli, G. Pelosi, G. L. Cetto (1997).

Ki-67 immunostaining in 322 primary breast cancers: assoziation with clinical and pathological variables and prognosis.

International Journal of Cancer, 74: 433-437.

Montanaro L, Arciola CR, Cenni E, Ciapetti G, Savioli F, Filippini F, Barsanti LA (2001).

Cytotoxicity, blood compatibility and antimicrobial activity of two cyanoacrylate glues for surgical use.

Biomaterials, 22(1): 59-66.

Nockemann PF (1992).

Die chirurgische Naht.

4. Auflage. Thieme Verlag.

Nur I, Lyahovetsky Y, Bar L, Schon M (2005).

Commercial fibrin sealant are not equivalent in a rabbit liver resection model which quantitativley evaluates hemostasis and formation of adhesions.

Eur Surg Res, 37: 159-165.

Osterberg B, Blomsted B (1979).

Effect of suture materials on bacterial survival in infected wounds. An experimental study.

Acta Chir Scand, 145(7):431-434.

Pantel B (2001).

Klebstoffe im Bogenbau.

In: Das Bogenbauer-Buch, Angelika Hörnig (Hrsg), Angelika Hörnig Verlag, 178-195.

Paulson, Erik K., Stephenson, G.Robert, Neal, Meg C., Rossin, V., Lawson, Jeffrey H (2000).

Use of Fibrin Sealant as a Hemostatic Agent after Liver Biopsy in Swine.

JVIR, 11: 905-911.

Plurad D, Chandrasoma S, Best C, Rhee P (2009).

Case Report: A Complication of Intracorporeal Use of Quickclot for Plevic Hemorrhage.

J Trauma, 66: 1482-1484.

Prior JJ, Powers N, DeLustro F (2000)

Efficacy of a novel hemostatic agent in animal models of impaired hemostasis.

J Biomed Mater Res, 53(3): 252-7.

Pruthi RS, Derksen E, Gaston K (2003).

Cyclooxygenase-2 as a potential target in the prevention and treatment of genitourinary tumors: a review.

J Urol., 169 (6): 2352-2359.

PubliReportage (2005).

Wissenschaftlicher Bericht über das Satelliten Symposium. Zürich 8.-10.Juni 2005, „Die Vielfalt der vliesgebundenen Gewebeklebung“.

TachoSil; swiss knife, 3: 18-19.

Pulford KAF, Sipos a, Cordell JL, Stross WP, Mason DY (1990).

Distribution of the CD68 macrophage/ myeloid associated antigen.

International Immunology, 2 (10): 973-980.

Pusateri A, Delgado AV, Dick EJ, Martinez RS, Holcomb JB, Ryan KL (2004).

Application of a granular mineral-based hemostatic agent (QuikClot) to reduce blood loss after grade V liver injury in swine.

J Trauma, 57(3): 555-62.

Recinos G, Inaba K., Dubose J, Demetriades D, Rhee P (2008).

Local and systemic hemostatics in trauma: a review.

Ulus Travma Acil Cerrahi Derg, 14(3): 175-181.

Richardson M (2004).

Procedures for cleansing, closing and covering acute wounds.

Nursing Times, 100 (4): 54-59.

Rodegra H (1982)

H. Hist Hosp. 1981-1982; 14: 179-190.

Rodgers KE, Girgis W, Campeau JD, et al. (1997).

Reduction of adhesion formation by intraperitoneal administration of anti-inflammatory peptide 2.

J Invest Surg, 10: 31-36.

Russel WMS, Burch RL (1959).

The Principles of Humane Experimental Technique.

http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/het-toc.

Methuen, London.

Sachs M (2000).

Die Methoden der Blutstillung in ihrer historischen Entwicklung.

Hämostaseologie, 20: 83-89.

Sadler TW (2003).

Medizinische Embryologie.

Kapitel: Omentum majus, 11. Auflage, Thieme Verlag, 249.

Schlesinger L, Musson RA, Johnson RB (1984).

Functional and biochemical studies of multinucleated giant cells from the culture of human monocytes.

J Exp. Med, 159: 1289.

Schmidt R (2001).

V Blut- und Blutkreislauf.

Aus: Physiologie kompakt.

4. Auflage, Springer, 182f.

Schneider G (2009).

Gewebeklebstoffe im HNO Bereich/ Tissue Adhesives in Otorhinolaryngology.

Laryngo-Rhino-Otol, 88: 156-164.

Scholzen T (2000).

The Ki67 protein: from the known and the unknown.

J Cell Physiol, (182): 311-322.

Schumpelick V (2008).

8. nahdran, 2/08, Magazin der aesculap AG&Co und der BBD Aesculap GmbH – Informationen für den Chirurgen, OP- und ZSVA-Team, Management und Einkauf; u.a. Prof. Dr. Dr. h. c. Volker Schumpelick.

Schürmann C, Seitz O, Sader R, Pfeilschifter J, Goren I, Frank S (2010).

Role of wound macrophages in skin flap loss or survival in an experimental diabetes model.

Br J Surg, 97: 1437-1451.

Schwartz M, Madariaga J, Hirose R, Shaver TR, Sher L, Chari R, Colonna II C, Heaton N, Mirza D, Adams R, Rees M, Lloyd D (2004).

Comparison of a New Fibrin Sealant With Standard Topical Hemostatic Agents.
Arch Surg, 139: 1148-1154.

Seidl W, Polterauer P, Funovics J (1982).

Blutstillung an parenchymatösen Organen mit Fibrin-Kollagen-Klebung in der Abdominalchirurgie (Leberresektionen).
Acta chir. Austriaca, 14 (1): 5-7.

Sheppard BB, de Virgilio C, Bleiweis M, Milliken JC, Robertson JM (1993).

Inhibition of intra-abdominal Adhesions: fibrin glue in a long term model.
Am Surg., 59 (12): 786-790.

Simhon D, Brosh T, Halpern M, Ravid A, Vasilyev T, Kariv N, Katzir A, Nevo Z (2004).

Closure of skin incisions in rabbits by laser soldering: I: Wound healing pattern.
Lasers Surg Med, 35 (1): 1-11.

Singh RP, Maheshwari V, Verma AK (2008).

Evaluation of Gelatin/ Resorcincol/ Aldehyde as a Hemostatic Agent and Tissue Adhesive: An Experimental Study in Rat.
Int Surg, 93(1): 25-31.

Skeist I (1962).

Introduction to Adhesives.
aus „Handbook of adhesives“, van Nostrand Reinhold Verlag, 3-13.

Smith DC (1973).

Lutes, glutes, cements and adhesives in medicine and dentistry.
Biomed Eng, 8 (3): 108-115.

Soybel DI (1997).

Ileus and bowel obstruction.
Hrsg.: Greenfield L.J.: Surgery: Scientific Principles and Practice., Philadelphia, Lippincott-Raven, S. 817-83.

Sözen S, Kısakürek M, Yıldız F, Gönültas M, Dincel AS (2011).

The effects of glutamine on hepatic ischemia reperfusion injury in rats.
Hippokratia, 15 (2): 161-166.

Spangler HP, Braun F, Holle I (1976).

Die lokale Anwendung von Fibrinogen und Kollagen zur Blutstillung der Herzchirurgie.
Wien. Med. Wochenschr.: 126: 86.

Spangler HP, Holle I, Braun F (1973).

Gewebeklebung mit Fibrin. Eine experimentelle Studie an der Rattenhaut.
Wien Klin. Wochenschr., 85(50): 827-9.

- Spotnitz WD, Falstrom JK, Rodeheaver GT (1997).**
The role of sutures and fibrin sealant in wound healing.
Surg. Clin. North Am., 77: 651-69.
- Stemberger A, Blümel G (1984).**
Fibrinklebung.
Springer Verlag. Hrsgb Scheele J, 3ff.
- Strubelt O, Siegers C.-P., Breining H (1970).**
Der Einfluß von Noradrenalin auf die Hepatotoxizität von Tetrachlorkohlenstoff und Allylalkohol.
Arch. Toxikol., Springer Verlag. 27: 53-566.
- TachoSil, PubliReportage (2005).**
Wissenschaftlicher Bericht über das Satelliten Symposium, Zürich 8.-10.Juni 2005, „Die Vielfältigkeit der vliesgebundenen Gewebeklebung“, TachoSil.
- Tatooles CJ, Braunwald NS (1966).**
The use of crosslinked gelatin as a tissue adhesive to control hemorrhage from liver and kidney.
Surgery, 60(4): 857-861.
- Terjung B, Lemnitzer I, Dumoulin FL, Effenberger W, Brackmann HH, Sauerbruch T, Spengler U (2003).**
Bleeding Complications after Percutaneous Liver Biopsy.
Digestion, 67: 138 – 145.
- Thomas L (2005).**
Aktivierte partielle Thromboplastinzeit.
In: L. Thomas (Hrsg) Labor und Diagnose, TH-Books 6. Aufl., S. 843ff
- Thomazini-Santos IA, Barraviera SRCS, Mendes-Giannini MJS, Barraviera SB (2001).**
Surgical adhesives.
J. Venom. Anim. Toxins, Vol. 7, Nr. 2 Botucatu.
- Tidrick, RT und Warner, ED (1944).**
Fibrin fixation of skin transplants.
Surgery, 15: 90.
- Tierschutzbericht (2011).**
- Toda K, Yoshitatsu M, Izutani H, Ihara K (2007)**
Surgical management of penetrating cardiac injuries using a fibrin glue sheet.
Interac Cardiovasc Thorac Surg., 6: 577-578.
- Tovar MC, Sanchez-Valverde MA, Agut A, Laredo FG, Murciano J (1998).**
Comparative study of air coagulation, fibrin sealant, and suture in experimental liver injury.
Eur J Surg, 164: 57-63.

- Treutner KH, Winkeltau G, Lerch MM, Stadel R, Schumpelick V** (1989).
Postoperative, intraabdominelle Adhäsionen - ein neues standardisiertes und objektiviertes Tiermodell und Testung von Substanzen zur Adhäsionsprophylaxe.
Langenbecks Arch Chir, 374: 99-104.
- Turner A. S., Parker D., Egbert B., Maroney M., Armstrong R., Powers N** (2002).
Evaluation of a Novel Hemostatic Device in an Ovine Parenchymal Organ Bleeding Model of Normal and Impaired Hemostasis.
J Biomed Mater Res, 63(1): 37-47.
- Uranüs S, Mischinger HJ, Pfeifer J, Kronberger L, Rabl H, Werkgartner G, Steindorfer P, Kraft-Kirz J** (1996).
Hemostatic Methods for the Management of Spleen and Liver Injuries.
World J. Surg. 20, 1107-1112.
- van der Poorten D, Kwok A, Lam T, Ridley L, Jones DB, Ngu MC, Lee AU** (2006).
Twenty-year audit of percutaneous liver biopsy in a major Australian teaching hospital.
Intern Med J, 36: 692-699.
- Verret PR, Fakir C, Ohmann C, Röher HD** (1989).
Preventing Recurrent Postoperative Adhesions: an experimental study in rats.
Eur Surg Res, 21: 267-273.
- Von Brunn W.** (1935).
Zur Geschichte der Blutstillung.
Aus: Die medizinische Welt 9: Originalien des Monats, Schattauer Verlag, S. 107ff.
- Weiss J, Maeß J, Nebendahl, Rossbach W** (Hrsg) (2003).
Haus- und Versuchstierpflege.
2. Auflage, Enke Verlag, S. 58-64.
- Wetzel FH** (1962).
14. Introduction to Rubber-based Adhesives.
aus "Handbook of adhesives", van Nostrand Reinhold Verlag, 188-208.
- Winslow BD, Shao H, Stewart RJ, Tresco PA** (2010).
Biocompatibility of adhesive complex coacervates modeled after the sandcastle glue of *Phragmatopoma californica* for craniofacial reconstruction.
Biomaterials, 31: 9373-9381.
- Wright FL, Hua HT, Velmahos G, Thoman D, Demitriades D, Rhee PM** (2004).
Case Report: Intracorporeal Use of the Hemostatic Agent Quikclot in a Coagulopathic Patient with Combined Thoracoabdominal Penetrating Trauma.
J Trauma, 56: 205-208.
- Wright JK, Kalns J, Wolf EA, Traweek F, Schwarz St, Loeffler CAK, Snyder W, Yantis LD, Eggers J** (2004).
Thermal Injury Resulting from Application of a Granular Mineral Hemostatic Agent.
J Trauma, 57: 224-230.

www.charite.de/tierschutz/download/Abbruchkriterien-Berliner-Tschb_2Auflage2009.pdf.

www.planet-wissen.de/natur_technik/tier_und_mensch/ratten.index.jsp.

www.research.bayer.de/de/chirurgische-klebstoffe.aspx (2008).

www.wistar.org/history.

Xiao E, Li D, Shen S, Zhou S, Tan L, Wang Y, Luo J, Wu Y, Tan C, Liu H, Zhu H (2003).

Effect of preoperative transcatheter arterial chemoembolization on apoptosis of hepatocellular carcinoma cells.

Chin Med J, 116 (2): 203-207.

Xiumei Mo, Hiroo Iwata, Yoshito Ikada (2010).

A tissue adhesives evaluated in vitro and in vivo analysis.

J Biomed Mater Res A, 294(A) (1): 326-332.

Young JZ, Medawar PB (1940).

Fibrin suture of peripheral nerves.

Lancet, 236: 126-128.

Zur B (2005).

Laborchemische Referenzbereiche für Wistarratten und C57BL/6-Mäuse.

Dissertation an medizinischer Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. vet. Gerhard Schultheiß danke ich für die Annahme der externen Arbeit, für die Geduld und die Zeit, die er investiert hat, um mich in meinem Promotionsvorhaben zu unterstützen. Herzlichen Dank für die nützlichen und hilfreichen Korrekturen und Vorschläge beim Anfertigen und Fertigstellen der Arbeit.

Gedankt sei auch **Herrn Prof. Dr. med. René H. Tolba** für das Überlassen des Themas, die Betreuung und Unterstützung, obwohl dies bei externen Arbeiten nicht immer einfach ist. Außerdem gilt ihm mein Dank für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten.

Herrn Dr. med. vet. Mamdouh Afify möchte ich für die großartige, fachliche und unverzichtbare Unterstützung beim Bearbeiten der Histologie danken.

Ebenfalls ein großes Dankeschön an **Ellen Krott** für die tolle, nette und schnelle Hilfe bei der Histologie und die vielen Anregungen bei der Auswertung, ohne die ich manchmal verzweifelt wäre.

Pascal Paschenda danke ich für die angenehme und kollegiale Unterstützung im Labor und während der Durchführung der Experimente sowie für die hervorragende Einarbeitung in das Laborleben.

Sehr herzlich möchte ich mich auch bei meinem Kollegen **Thaddäus Stopinski** für die schöne Zeit im Institut bedanken. Ohne ihn hätte ich bestimmt nicht so viel Freude und Spaß an der Arbeit gefunden, außerdem durfte ich unglaublich viel von ihm lernen, und habe von seinem umfangreichen Wissen und seiner Erfahrung viel mitnehmen dürfen. Zudem konnte ich immer auf seine Hilfe zählen.

Ein großer Dank geht natürlich auch an **alle anderen Kollegen** des Institutes - hier sei im Einzelnen vor allem **Frau Dr. med. vet. Kira Scherer** erwähnt, die mich während der gesamten Zeit großartig unterstützt und mir vieles ermöglicht hat, immer ein offenes Ohr für mich hatte und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Mein spezieller Dank gilt meiner **Oma Irene Sattler** für die moralische und finanzielle Unterstützung in den ersten Jahren des Studiums. Sie hat mir den Traum des Tiermedizinstudiums ermöglicht und es ist unendlich traurig, dass sie das Ende

meines Studiums und das Fertigstellen der Promotion nicht mehr miterleben durfte. Daher möchte ich ihr diese Arbeit widmen und von ganzem Herzen für alles danken.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei meiner **Mutter Martina Sattler-Woitok** bedanken, die mich ebenfalls jahrelang finanziell und moralisch unterstützt und es mir somit ermöglicht hat, mich komplett auf mein Studium konzentrieren. Ohne sie hätte ich das Studium und die Promotion in dieser Form nicht beenden können.

Ebenso möchte ich auch meinem **Vater Dr. rer. nat. Joachim Woitok** danken, dass er stets an mich geglaubt hat und nie daran gezweifelt hat, dass die Promotion doch noch fertig werden würde. Danke für jegliche Unterstützung während des Studiums, außerdem auch ein riesiges Dankeschön für die Hilfe bei sämtlichen Umzügen, die studiumsbedingt nötig waren, und nicht zuletzt für das Korrekturlesen in der letzten Phase der Promotion.

Bei meinen **Großeltern Rita und Norbert Woitok** möchte ich mich für die fortwährende mentale Unterstützung bedanken.

Gedankt sei auch all meinen **Freunden und Leidensgenossen** (die nur aus Platzgründen ungenannt bleiben, denen ich jedoch nicht weniger danke!), die immer ein offenes Ohr hatten und zu mir gehalten haben, obwohl ich oft zu wenig Zeit für sie hatte und dafür umso mehr Zeit am Schreibtisch verbracht habe. Außerdem möchte ich mich bei meinem Hund **Kyra** bedanken, der mir besonders im Studium eine große Unterstützung war und ohne den ich das Studium und die Prüfungen sicherlich nicht so gut bewältigt hätte.

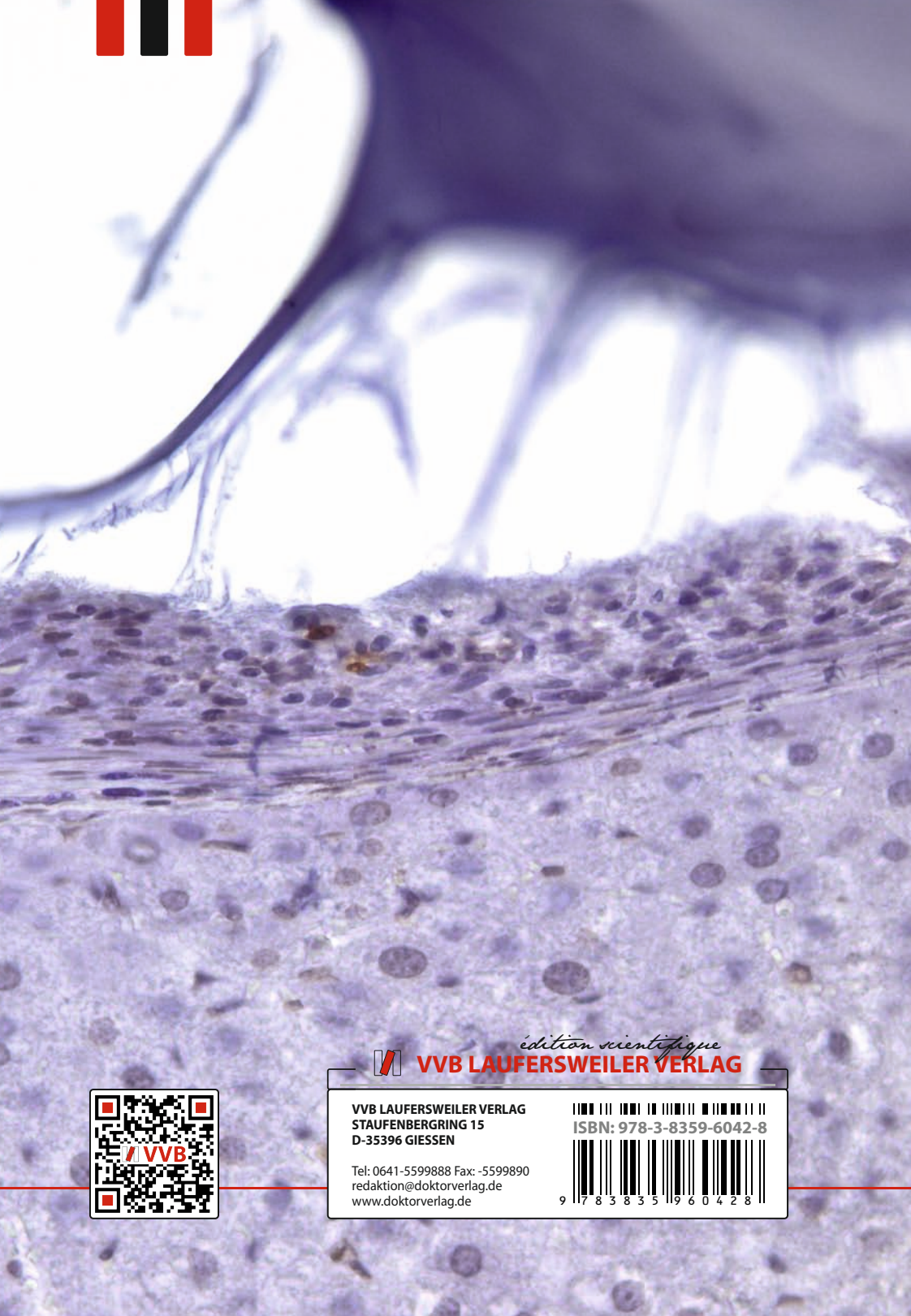
Und nicht zuletzt bedanke ich mich bei allen Versuchstieren, die ihr Leben für den Erfolg der Forschung und den Fortschritt der Medizin lassen mussten.

Danke!

9. Erklärung

Ich erkläre: ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündliche Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zu Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ sind, eingehalten.

Anna Woitok



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6042-8



9 783835 196042 8